



**MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**Secrétariat d'Etat
à l'enseignement supérieur et à la recherche**

Résumés non techniques des projets autorisés (14)

1401- Contexte: L'épigénétique étudie les mécanismes de régulation d'expression des gènes sans modification de la séquence d'ADN, causées par exemple par des modifications chimiques telles que la méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN a lieu sur le carbone 5 de la base cytosine et est catalysée par les enzymes de la famille des DNMT (ADN méthyltransférases). La méthylation de l'ADN a le potentiel de réprimer l'expression des gènes et joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire et l'apparition des cancers. Cependant les fonctions et mécanismes de régulation de la méthylation de l'ADN sont mal connus.

Objectifs: Le projet utilisera des modèles de souris génétiquement modifiées dans les buts suivants :

1- Etudier le rôle de la méthylation de l'ADN dans les décisions cellulaires au cours du développement de l'embryon.

2- Identifier des facteurs qui recrutent la méthylation de l'ADN vers ces gènes cibles dans l'ADN.

Le projet fera avancer la connaissance fondamentale sur la régulation de la méthylation de l'ADN et permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter les anomalies épigénétiques dans les cancers.

Les procédures décrites prévoient l'utilisation de 180 souris, en adéquation avec la règle des 3R :

Réduire: Nous avons réfléchi à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Pour cela, nous utiliserons des méthodes de cartographie épigénétique optimisées pour de très faibles quantités de cellules (~5000 cellules). Nous limiterons nos analyses statistiques de méthylome et transcriptome à 3 échantillons par condition. Enfin nous utiliserons des kits permettant de préparer des ADNs et ARNs à partir du même échantillon afin de réduire encore le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner: Les souris sont élevées selon les recommandations de la directive européenne 2010/63/UE dans des cages de grande taille et enrichies par un matériel de nidification. Nous n'effectuerons pas d'expérimentation invasive induisant une douleur ou stress sur des animaux vivants. Toutes les lignées génétiquement modifiées déjà existantes n'induisent pas de phénotype douloureux. Pour les lignées génétiquement modifiées nouvellement créées, les animaux seront surveillés quotidiennement pour détecter précocement l'apparition éventuelle de phénotypes induisant une douleur ou un stress. Les animaux seront euthanasiés si nous observons l'un des signes suivants : perte de poids > 20%, tumeurs, mobilité réduite, animaux prostrés, poil mal toiletté, rythme respiratoire anormal, vocalisations non sollicitées, pertes de comportements sociaux.

Remplacer: Les modèles de cultures cellulaires in vitro ne peuvent pas se substituer efficacement aux analyses in vivo car les cellules cultivées accumulent rapidement de nombreuses anomalies épigénétiques. C'est pourquoi nous effectuerons l'ensemble de nos expériences de biologie moléculaire sur des échantillons de tissus primaires.

1402- En plus de la longueur d'onde (couleur) et de l'intensité (le nombre de photons par unité de temps), la lumière a un autre attribut physique que beaucoup d'animaux invertébrés peuvent détecter, nommée polarisation. Les anchois, poissons du genre *Engraulidae* forment un groupe très rare chez les vertébrés car ils présentent des structures spécialisées capables de détecter la polarisation de la lumière, cela a été démontré par des études en électrophysiologie sur l'anchois du Pacifique (*Engraulis mordax*). Le but des expériences de ce projet est de révéler si l'anchois Européen (*Engraulis encrasicolus*) peut faire la différence entre la lumière polarisée et non polarisée en utilisant pour cela des études comportementales. L'objectif de ce projet est d'évaluer s'ils utilisent la lumière polarisée pour améliorer les performances de recherche de leur nourriture (principalement le zooplancton) en milieu naturel. A cet effet, ce projet étudiera expérimentalement comment la lumière polarisée module le comportement de recherche de nourriture chez des larves d'anchois Européen et la capacité de détection de la lumière polarisée chez des juvéniles de la même espèce. La comparaison entre les deux stades permettra de vérifier si l'utilisation de la polarisation varie avec l'âge et la maturation des organes de la vision. Les animaux seront capturés en milieu naturel, puis acclimatés et élevés au laboratoire. Pour les larves, un nombre total de 50 individus sera utilisé dans ces expériences (cinq poissons par expérience x 5 répétitions x 2 conditions) et pour les juvéniles, 20 individus au total seront testés. Au total 70 animaux seront utilisés. La règle des 3R a été prise en compte de la façon suivante : Le Remplacement n'est pas possible dans ces expériences puisqu'il faut des animaux vivants de cette espèce en particulier. La Réduction a été prise en compte en limitant au maximum le nombre d'animaux employés en se basant sur des travaux de même nature réalisés antérieurement sur une autre espèce. Enfin, le raffinement comprendra d'une part l'optimisation des conditions d'élevage

pour cette espèce de poisson marin et, d'autre part, la réalisation des manipulations sous anesthésie concernant le transfert entre systèmes d'élevage et d'expérience et la pesée et la mesure de la longueur une seule fois par individu en post expérience.

1403- La neuropathie optique de Leber est une maladie héréditaire qui se manifeste par une baisse brutale de la vision et qui survient habituellement chez l'homme jeune. La maladie est causée par une mutation génétique qui entraîne l'expression d'une protéine altérée ne remplissant plus ses fonctions. Cette mutation a pour conséquence un mauvais fonctionnement du nerf optique qui transmet les informations de l'œil au cerveau, plus exactement dans les cellules ganglionnaires de la rétine, dont les prolongements forment le nerf optique. La maladie semble atteindre une personne sur 15 000 à une sur 50 000. Elle est présente dans toutes les régions du monde. Cette affection d'origine génétique se déclare en général entre 20 et 30 ans pour les hommes et entre 30 et 40 ans pour les femmes mais touche plus particulièrement les hommes. Aucun traitement n'existe à ce jour. Dans le cadre d'une maladie causée par la déficience ou le dysfonctionnement d'une protéine essentielle, la thérapie génique consiste à apporter des gènes thérapeutiques aux cellules « malades ». L'utilisation d'un gène comme médicament permet d'obtenir l'expression continue d'une protéine thérapeutique au sein des cellules cibles. Dans ce projet nous chercherons à valider l'efficacité d'un vecteur de thérapie génique administré par la voie intra oculaire. Le modèle expérimental in vivo est indispensable pour mener notre étude. Ce vecteur ayant déjà fait ses preuves sur des modèles cellulaires et animaux, 64 rats seront utilisés. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement

décris au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». Chaque animal est utilisé pour l'ensemble des étapes du projet, de l'injection intraoculaire au prélèvement des tissus d'intérêt pour l'analyse. Toutes les précautions seront prises dans nos méthodes et conditions expérimentales afin de réduire à son maximum le stress et la souffrance animale. L'ensemble des expériences est mené par des personnels qualifiés, et nous utiliserons des méthodes d'anesthésies appropriées lors des interventions. L'ensemble des expériences sera mené dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur.

La Rétinopathie Pigmentaire (RP) est une maladie oculaire génétique grave qui touche environ une personne sur 3000 au niveau mondial. Cette maladie se caractérise par une perte progressive de la vision. Aucun traitement n'est disponible à l'heure actuelle. Le but de notre étude est de pouvoir proposer une solution thérapeutique aux patients atteints de RP afin de prévenir l'évolution de la maladie. L'équipe a identifié deux gènes *Nxn1* et *Nxn2* qui codent pour des facteurs qui seraient impliqués dans la survie des photorécepteurs à cônes (cellules les plus importantes pour la vision). Nous nous proposons de faire ici de faire une étude préclinique sur des modèles animaux de rétinites pigmentaires. Cette étude sera réalisée sur des souris atteintes de rétinite pigmentaire: souris rd1 et souris rd10. Ces 2 modèles sont couramment utilisés par la communauté scientifique dans le cadre d'études menées sur cette maladie.

Après injection de ces facteurs à ces souris, nous évaluerons leur potentiel effets protecteur sur la vision des souris à l'aide d'un électrorétinogramme (ERG) en condition photopique (technique non invasive). Des études histologiques de la rétine seront aussi réalisées sur la rétine de ces animaux. Au total 300 animaux seront nécessaires à cette étude incluant les contrôles et les différentes doses de facteurs testées.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

1404- Les agents transmissibles non-conventionnels (ATNC ou prions) sont responsables des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST), dont la forme la plus connue est le variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) ou « maladie de la vache folle ». L'extrême résistance des prions aux procédés d'inactivation amènent les sociétés travaillant sur les procédés de sécurisation de l'instrumentation médicale à tester de nouveaux procédés physicochimiques contre ces agents pathogènes. Cette extrême résistance et l'absence d'un test diagnostique font que le risque de santé publique attendant aux prions, notamment le risque de transmission interhumaine lié à l'usage d'instruments médicaux réutilisables, n'est que partiellement appréhendé. Sécuriser l'instrumentation médicale réutilisable au travers d'une décontamination efficace permettrait donc de mieux maîtriser ce risque. De nouveaux procédés ont été dernièrement reconnus efficaces par les agences réglementaires, dont l'agence française (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé ANSM). Toutefois, la recherche et la mise sur le marché de produits tout aussi efficaces mais moins susceptibles d'abimer les surfaces des instruments médicaux reste encore d'actualité. Un nouveau programme de recherche a été ainsi initié pour démontrer l'efficacité de nouveaux produits « doux », alcalins ou enzymatiques vis-à-vis des prions. Dans ce cadre, et en accord avec le « protocole standard prions (PSP) » de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (voir http://www.anism.sante.fr/dossier-thematique/Creutzfeldt-Jakob_et_produits_de_sant%C3%A9), des expérimentations in vitro ont tout d'abord démontré l'efficacité des produits que l'on souhaite tester lors de cette étude in vivo vis-à-vis de 6 souches différentes de prions, dont la souche de référence, la souche de tremblante expérimentale adaptée au hamster, la souche 263K et une souche du variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ). Le « protocole standard prions (PSP) » exige une confirmation de ces résultats biochimiques par un test d'infection d'une souche de rongeur. Cette phase expérimentale chez l'animal est indispensable et impossible à remplacer par une autre approche, même cellulaire, car les prions ne se répliquent en quantité que chez certaines espèces animales, comme les rongeurs. Cette approche augmente la sensibilité du test, donc garantira aux patients une meilleure biosécurité de l'instrumentation médicale qui sera traitée dans ces machines. Le nombre d'animaux a été ajusté en favorisant dans un premier temps les expérimentations in vitro et en réduisant le nombre d'animaux

par groupe au minimum nécessaire pour conserver la puissance du test statistique. Cette phase expérimentale engagera 390 animaux nés et élevés dans un établissement reconnu. Des protocoles d'anesthésie préalablement définis et validés avec l'équipe vétérinaire, seront utilisés tout au long de ces expérimentations de 12 mois. Le bien-être des animaux sera amélioré par la mise en place d'un enrichissement de milieu. De même, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant les signes caractéristiques d'infection et le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée au moindre signe de souffrance. Au terme des 12 mois post-inoculation, tous les animaux seront euthanasiés afin de rechercher la trace d'infection dans leur cerveau.

1405- Les troubles affectifs résultent d'une interaction gène-environnement et le stress est un des facteurs de risque qui peut favoriser leur apparition. La capacité à s'adapter au stress a un impact significatif sur la physiologie, l'humeur et la santé à long terme de chaque individu. L'adaptation au stress est variable d'un individu à un autre, c'est ce que l'on appelle la réponse adaptative et mal-adaptative. Nous proposons d'étudier les changements cérébraux en imagerie et en biologie moléculaire, associés à la réponse au stress, normale et pathologique chez un modèle rongeur. Pour cela, nous utiliserons des méthodes d'imagerie par résonance magnétique (IRM) pour comparer les effets d'un stress chronique chez des rongeurs que nous regrouperons en fonction de leur différente sensibilité au stress. Différentes techniques d'IRM (permettant d'obtenir des images des différentes structures anatomiques et de leur connexion à la fois structurelle et fonctionnelle), seront utilisées pour visualiser et caractériser les différences cérébrales au niveau anatomique et fonctionnel de la réponse au stress. Dans le même temps, nous identifierons les marqueurs moléculaires du stress. Cette véritable cartographie anatomique et fonctionnelle du cerveau des animaux, réagissant différemment au stress, nous permettra de mettre en évidence les réseaux de régions cérébrales impliqués dans la vulnérabilité au stress, et l'approche biochimique menée en parallèle, d'identifier des bio-marqueurs de la résilience. Par ailleurs, ces mêmes expériences seront réalisées avant et après administration de substances pharmacologiques supposées prévenir et limiter les effets du stress. Caractériser les effets du stress nécessite l'étude sur un organisme intégré ce qui n'est pas actuellement réalisable sur des modèles *in vitro*. L'étude est construite dans le respect des règles éthiques, afin de réduire au plus juste le nombre d'animaux utilisés et de diminuer au maximum les contraintes liées au protocole : - Le protocole a été construit de façon à ce que l'ensemble des paramètres puisse être mesuré sur chaque animal (taux de corticostérone, études du comportement et imagerie anatomique et fonctionnelle), permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux (n=500) provenant d'élevages autorisés. - les séquences IRM ont été optimisées afin de réduire au plus juste la durée des examens tout en maintenant une excellente qualité des résultats. Une surveillance particulière de l'état de santé des animaux sera mise en place par l'application d'échelles cliniques journalières et de critères d'arrêts, tout au long de l'étude. Dans le cas d'effet inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

1406- Le glioblastome multiforme (GBM) ou glioblastome, également connu sous le nom d'astrocytome de grade 4, est la tumeur primitive du cerveau la plus fréquente et la plus agressive. Le traitement peut comprendre de la chimiothérapie, de la radiothérapie et de la chirurgie. Ces mesures sont considérées comme palliatives, c'est-à-dire qu'elles ne permettent pas la guérison. L'espérance de vie à cinq ans de cette maladie a peu évolué ces trente dernières années, et ne dépasse pas les dix pour cent. Même avec une résection chirurgicale complète de la tumeur, combinée aux meilleurs traitements disponibles, le taux de survie au GBM reste très faible. Dans le cadre d'un projet de développement de technologies ultrasonores pour le traitement des tumeurs cérébrales, nous avons mis au point le dispositif ultrasonore implantable adéquat (SonoCloud). Ce système a pour objectif, grâce aux ultrasons, d'induire une ouverture mécanique de la barrière hématoencéphalique (BHE). Cette barrière biologique représente l'un des obstacles majeurs à l'efficacité des chimiothérapies dans le traitement de ces cancers. En effet l'imperméabilité de la BHE limite la diffusion des molécules thérapeutiques protégeant ainsi les cellules tumorales. Une ouverture mécanique de cette barrière est réalisable à l'aide des ultrasons comme nous l'avons montré chez différentes espèces animales dont le primate. Ces ultrasons de contact émis par ce dispositif permettent l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique de façon répétée sans toxicité, permettant à des drogues de chimiothérapie (par ex) injectées par voie veineuse, de diffuser dans le parenchyme cérébral de façon beaucoup plus efficace (x4). Grâce à ce principe, nous espérons que les chimiothérapies pourront mieux traiter les gliomes et métastases cérébrales. Pour pouvoir réaliser des essais cliniques ce dispositif innovant (IRM compatible) émetteur d'ultrasons, implanté dans l'épaisseur osseuse de la boîte crânienne, a été adapté afin de remplir les critères de la réglementation sur les dispositifs médicaux implantables actifs (DMIA). Ce dispositif modifié doit donc être testé préalablement chez l'animal. L'objectif de cette dernière expérimentation est double :

- Pharmacologique : analyse par PET scan du passage d'anticorps marqués lors de 3 séances d'ouverture de la BHE, ce qui permettrait d'étendre le champ clinique du dispositif aux maladies de type neurodégénérative
- Réglementaire par l'histologie : récolter des informations de biocompatibilité à 6 mois d'implantation, pour satisfaire aux recommandations réglementaires. Le modèle primate se justifie par les similitudes anatomiques fortes permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation en pratique clinique chez l'Homme. Les 2 animaux utilisés pour ce projet sont nés et élevés en captivité dans un élevage reconnu. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'efficacité de ce dispositif. La réalisation de plusieurs examens d'imagerie sur chaque animal permet de limiter le nombre total d'animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

1407- L'imagerie par résonance magnétique (IRM) de diffusion est devenue un outil essentiel pour visualiser de manière non invasive l'organisation structurelle du cerveau. Elle est couramment utilisée pour le diagnostic clinique / préclinique de l'ischémie cérébrale, du cancer et pour l'étude de la connectivité anatomique des faisceaux de la substance blanche. Il s'agit d'un procédé unique pour observer de manière non invasive la structure des tissus par l'intermédiaire de la diffusion des molécules d'eau dans ces tissus. Plus important encore, l'IRM de diffusion est en passe de devenir la technique de référence pour l'imagerie dynamique des fonctions cérébrales. En effet, une étude a montré que l'IRM de diffusion fonctionnelle (IRMfD) reflète le fonctionnement du cerveau dans le cortex visuel humain. Une autre étude chez un modèle rongeur a montré que la réponse IRMfD, qui est couplée à la diffusion de l'eau, suit beaucoup plus fidèlement et précisément dans le temps l'activité électrique des neurones que l'IRM fonctionnelle classique (BOLD), qui est corrélée au débit sanguin. Ces résultats indiquent que le signal IRMfD n'est pas d'origine vasculaire mais cellulaire. Il serait relié au ralentissement de l'eau dans les tissus suite à un gonflement cellulaire des neurones et/ou des astrocytes. Pour tester cette hypothèse, nous proposons d'utiliser des agents pharmacologiques chez un modèle rongeur afin de moduler séparément le gonflement des neurones et celui des astrocytes. Les structures neurovasculaires de la triade [neurones-astrocytes-vaisseaux sanguins] étant intimement interdépendants, la manipulation pharmacologique d'une structure donnée est susceptible de modifier le fonctionnement normal des autres structures. Le but de ce projet est de comparer les différents signaux d'IRM fonctionnelle (IRMfD, et BOLD) avec l'activité des neurones (électrophysiologie) après injection de la molécule pharmacologique d'intérêt. Les retombées de ce projet auront un fort impact pour mieux comprendre les signaux de neuroimagerie utilisés pour étudier l'activité neuronale chez les Hommes et les animaux. Il ouvrira également de nouvelles perspectives pour des études précliniques et cliniques de l'activité cérébrale pendant une anesthésie ou des traitements pharmacologiques qui perturbent la circulation sanguine. Bien que quelques études aient caractérisées in vitro ou ex vivo les effets des champs magnétiques sur des cellules en culture ou des échantillons de cerveau, il est nécessaire d'évaluer ces effets sur un organisme intégré pour lequel les structures neurovasculaires de la triade neurones-astrocytes-vaisseaux fonctionnent. Ce projet est réalisé sur un modèle rongeur en s'assurant qu'aucune angoisse, douleur ou souffrance ne soit ressentie lors de toute intervention sur les animaux, et pour cela des protocoles d'anesthésie et d'analgésie sont définis et validés par une équipe vétérinaire. Une observation quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer de leur bien-être. Dans le cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou de décider de l'euthanasie. Le nombre d'animaux (138) a été réduit au minimum nécessaire pour détecter un effet statistique. Après acquisition des données sur plusieurs animaux, si aucun effet n'est observé pour une des molécules, l'étude de celui-ci sera arrêtée.

1408- Les allergies alimentaires ont fortement progressé ces dernières années, s'accompagnant de l'apparition de nouvelles formes d'allergies graves et/ou de la persistance d'allergies autrefois considérées comme transitoires. Ainsi, l'allergie au lait de vache, touchant près de 3% des enfants de moins de 2 ans, perdure de plus en plus longtemps, impactant le développement global de l'enfant mais également la vie sociale et financière de la famille. A ce jour, aucune thérapie n'existe pour ces pathologies: seule l'éviction de l'aliment permet une résolution des symptômes. Cependant, l'éviction ne permet pas de prévenir la survenue de réactions potentiellement graves suite à une ingestion accidentelle, ce qui est une source de stress permanente pour le patient et son entourage. Les allergies alimentaires résultent de réponses immunitaires inappropriées et exagérées se développant chez certaines personnes prédisposées. Ces réponses sont dirigées contre certains constituants de l'aliment, les protéines. L'objectif du projet est de développer une nouvelle approche thérapeutique pour l'allergie aux protéines de lait de vache. L'approche consiste ainsi à utiliser conjointement : - une voie non invasive (cutanée) dont l'efficacité a été démontrée dans le contexte du traitement de l'allergie alimentaire à l'arachide, et permettant d'éviter la survenue de réaction allergique généralisée - dont la plus grave est le choc anaphylactique - des produits dérivés des protéines du lait de vache montrant une allergénicité réduite, limitant ainsi la survenue de réactions allergiques locales, mais augmentant potentiellement leur efficacité thérapeutique. L'utilisation de modèles animaux est nécessaire pour démontrer l'efficacité thérapeutique de cette nouvelle approche. En effet, des modèles cellulaires ou informatiques ne permettraient pas de reproduire le système immunitaire dans son ensemble et ses interactions avec l'intestin et la peau. Le rongeur possède notamment un système immunitaire bien décrit, fonctionnant comme celui de l'Homme dans son induction et sa régulation. Les outils permettant son analyse sont nombreux et il est possible de reproduire une allergie au lait de vache chez ces animaux. En amont, nous mettrons en œuvre différents tests in vitro (tests immunochimiques et modèles cellulaires) afin de sélectionner les produits dérivés des protéines du lait de vache les plus à même d'être efficaces en immunothérapie, limitant ainsi le nombre d'entités à tester et donc d'animaux en expérimentation. Le projet prévoit le recours à un minimum nécessaire de 440 rongeurs, nés et élevés en captivité par des fournisseurs agréés, permettant de ne pas compromettre la validité statistique des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour limiter toute souffrance lors des interventions sur les animaux et tout au long du protocole. L'état de santé et le bien-être des animaux seront néanmoins surveillés tout au long de l'expérience, nous permettant d'intervenir immédiatement et de façon appropriée dès le moindre signe de souffrance.

1409- La grippe est une maladie virale fréquente et contagieuse causée par plusieurs virus à ARN de la famille des Orthomyxoviridae. Elle est responsable d'épidémies saisonnières (propagation rapide d'une maladie infectieuse) et, plus rarement, de pandémies plus meurtrières (épidémie qui s'étend sur une large zone : parfois la planète). Les objectifs de cette étude sont, dans un premier temps, de développer un modèle d'infection par le virus de la grippe mimant le syndrome grippal humain et, dans un second temps, d'évaluer l'efficacité de nouveaux « candidats vaccins ». Le but est d'identifier des vaccins plus efficaces contre un grand nombre de souches virales différentes, incluant notamment le virus H1N1 responsable de la pandémie grippale de 2009. Les retombées de cette étude auront des applications cliniques chez l'Homme à moyen terme pour combattre les souches virales circulant actuellement et, à plus long terme, pour prévenir l'émergence de nouvelles

souches recombinantes ou d'origine animale. Les stratégies de vaccination étudiées seront comparées au vaccin commercial actuellement utilisé contre la grippe saisonnière (Vaxigrip®) chez l'Homme. Ce dernier induit une immunité contre seulement 3 sous-types de virus grippaux (les plus représentés dans les infections saisonnières des années précédentes). L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme. Le primate non humain a été choisi afin d'avoir, d'une part, un modèle d'infection par le virus de la Grippe comparable à la maladie humaine et, d'autre part, une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'Homme. Le projet prévoit d'utiliser au maximum 74 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques adaptés aux petits effectifs. Les méthodes expérimentales ont été conçues pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : 1) Les différentes interventions (prélèvements de sang, de fluide nasal, trachéal et bronchoalvéolaire, immunisations, infection expérimentale) seront faites sous anesthésie générale, 2) Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour obtenir des résultats fiables. Les animaux seront hébergés en groupe avant infection et en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales pendant la phase d'infection (l'état fébrile des animaux n'excédant pas deux semaines après l'infection). Cet hébergement individuel est nécessaire pour maîtriser les éventuelles surexpositions virales et les contaminations croisées entre individus. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera sollicité afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure de « bien-être animal » de l'établissement.

1410- Le choriocarcinome est un cancer malin du placenta qui métastase dans différents organes vitaux comme le foie et le poumon. Les mécanismes de sa progression sont inconnus à ce jour. Nous travaillons actuellement sur les cellules issues de choriocarcinome humain (JEG3) dans des systèmes in vitro et souhaitons développer un modèle animal. Le recours à un organisme entier vivant est en effet indispensable pour observer la progression d'une tumeur dans son environnement physiologique.

Le modèle consiste à implanter des cellules humaines issues de choriocarcinome placentaire chez des femelles gestantes de rongeur immunodéficient, afin d'étudier in vivo la progression tumorale. La souris présentant un développement placentaire similaire à celui de la femme, nous avons choisi d'utiliser sur ce modèle pour notre projet. Nos données préliminaires in vitro ont démontré le caractère tumoral des cellules JEG3 qui seront greffées chez les rongeurs. Les animaux recevront les cellules JEG3, dotées d'un marqueur bioluminescent, dans le placenta ou la corne utérine. Le développement tumoral sera suivi en imagerie à l'aide du système IVIS. Les métastases sont attendues dans le poumon, le vagin, le foie et l'estomac. Les animaux seront euthanasiés à différents moments de leur gestation afin de suivre le développement tumoral au niveau placentaire et au-delà de cet organe. Si le développement tumoral se confirme, nous envisageons dans un deuxième temps de traiter les animaux avec des facteurs anti-angiogènes afin de tester le potentiel thérapeutique de ces derniers. Le modèle facilitera donc le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre cette maladie. Au total nous envisageons d'utiliser 92 animaux nés et élevés dans nos installations. 48 serviront à la détermination du site (2 choix : placenta ou corne utérine) et du meilleur moment d'injection (4 choix : 8.5 ; 11.5, 12.5 ou 14.5 jours après l'accouplement). Chaque groupe comptera 6 animaux qui seront euthanasiés à J18.5. L'expérience suivante consistera à comparer trois groupes : contrôles (x6), injectés avec des cellules normales (x6), injectés avec des cellules tumorales (10), soit 22 animaux euthanasiés à J18.5. La même combinaison de 22 animaux sera répétée avec euthanasie 3 mois après la mise bas, afin de suivre la progression tumorale dans différents organes. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire pour atteindre une significativité statistique. Un test t de Student sera utilisé pour comparer le groupe traité aux groupes contrôles (non traités ou traités avec des cellules non tumorales). La mise au point de ce protocole sera longue mais nécessaire pour la poursuite du projet. La technique retenue sera rapidement publiée pour servir à d'autres équipes dans le souci de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Tout le long de ce protocole, l'état de santé des animaux sera surveillé grâce aux grilles d'évaluations du niveau de douleur. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions. Pour toutes les interventions chirurgicales, les animaux sont anesthésiés et reçoivent un traitement analgésique pour leur éviter toute souffrance inutile.

1411- La grippe est une maladie virale fréquente et contagieuse causée par plusieurs virus à ARN de la famille des Orthomyxoviridae. Elle est responsable d'épidémies saisonnières (propagation rapide d'une maladie infectieuse) et, plus rarement, de pandémies plus meurtrières (épidémie qui s'étend sur une large zone : parfois la planète). Les objectifs de cette étude sont, dans un premier temps, de développer un modèle d'infection par le virus de la grippe mimant le syndrome grippal humain et, dans un second temps, d'évaluer l'efficacité de nouveaux « candidats vaccins ». Le but est d'identifier des vaccins plus efficaces contre un grand nombre de souches virales différentes, incluant notamment le virus H1N1 responsable de la pandémie grippale de 2009. Les retombées de cette étude auront des applications cliniques chez l'Homme à moyen terme pour combattre les souches virales circulant actuellement et, à plus long terme, pour prévenir l'émergence de nouvelles souches recombinantes ou d'origine animale. Les stratégies de vaccination étudiées seront comparées au vaccin commercial actuellement utilisé contre la grippe saisonnière (Vaxigrip®) chez l'Homme. Ce dernier induit une immunité contre seulement 3 sous-types de virus grippaux (les plus représentés dans les infections saisonnières des années précédentes). L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme. Le primate non humain a été choisi afin d'avoir, d'une part, un modèle d'infection par le virus de la Grippe comparable à la maladie humaine et, d'autre part, une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'Homme. Le projet prévoit d'utiliser au maximum 74 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu. Le nombre

d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques adaptés aux petits effectifs. Les méthodes expérimentales ont été conçues pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : 1) Les différentes interventions (prélèvements de sang, de fluide nasal, trachéal et bronchoalvéolaire, immunisations, infection expérimentale) seront faites sous anesthésie générale, 2) Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour obtenir des résultats fiables. Les animaux seront hébergés en groupe avant infection et en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales pendant la phase d'infection (l'état fébrile des animaux n'excédant pas deux semaines après l'infection). Cet hébergement individuel est nécessaire pour maîtriser les éventuelles surexpositions virales et les contaminations croisées entre individus. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera sollicité afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure de « bien-être animal » de l'établissement.

1412- Dans le cadre des myopathies, les fibres musculaires disparaissent et ne sont pas renouvelées. Notre projet vise à comprendre les mécanismes moléculaires de maintien et de réparation des fibres musculaires. Nous allons faire varier l'expression d'une enzyme appelée CNOT6L dans les fibres musculaires, afin de mesurer son impact sur l'efficacité du processus de régénération. Les fonctions particulières de CNOT6L, qui est essentiellement exprimée dans le muscle squelettique, sont peu connues. A long terme, cette molécule pourrait être une cible thérapeutique intéressante. Le modèle rongeur est indispensable à l'étude du phénomène in vivo. Toutes les approches expérimentales cellulaires et de modélisation en amont ont été validées. Le projet portant sur la réparation musculaire, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux adultes (90 rongeurs) a été réduit à son minimum nécessaire pour garantir la validité biologique et statistique de l'expérience. Toutes les précautions seront prises pour assurer le bien-être des animaux durant toute la procédure : les rongeurs seront anesthésiés pour éliminer leur souffrance pendant les actes invasifs. La douleur sera limitée par l'emploi d'analgésiques pendant la chirurgie. Le comportement des rongeurs, leur poids seront surveillés quotidiennement. Des critères d'arrêt ont été mis en place pour prendre en compte d'éventuels effets inattendus et, dans ce cas, tout sera mis en œuvre pour apporter des traitements appropriés ou décider d'une euthanasie.

1413- La Tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle qui permet d'explorer in vivo de manière non-invasive chez l'Homme, la physiologie et la physiopathologie du système nerveux central et périphérique. L'imagerie moléculaire en TEP est de plus en plus employée en clinique pour le diagnostic et le suivi thérapeutique de certaines pathologies comme le cancer ou les maladies neurodégénératives. Cette technique nécessite le développement, la validation et l'utilisation de molécules (dites radiotraceurs) spécifiques de cibles moléculaires et impliquées dans les phénomènes biologiques à étudier. Ces molécules, marquées par des isotopes radioactifs, sont injectées par voie intraveineuse avant l'acquisition des images TEP. La validation de ces radiotraceurs comporte plusieurs étapes depuis la sélection de la molécule, son radiomarquage, sa caractérisation biochimique et pharmacologique in vitro (sur des cellules, des membranes, etc.), jusqu'à son essai chez l'animal (requis par la réglementation) puis son utilisation chez l'Homme. Ces nouveaux radiotraceurs permettent de réaliser des images de certaines cibles moléculaires (récepteur particulier, dépôt de plaques amyloïdes, etc..) permettant ainsi d'étudier le rôle de ces cibles dans certaines pathologies. Le but de ce projet est de caractériser et de valider des radiotraceurs pour la TEP chez le primate non humain. Ce projet impliquera le développement de 6 radiotraceurs sur une période de 5 ans. Le choix du modèle de primate non humain est justifié par des similitudes anatomiques et fonctionnelles fortes permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation en pratique clinique chez l'Homme. Les animaux utilisés dans ce projet sont nés et ont été élevés en captivité dans un établissement reconnu. Leur nombre (8) est réduit au minimum nécessaire pour assurer la validité des résultats. Un examen d'imagerie sera réalisé sur ces animaux tous les 15 jours au maximum. Les conditions expérimentales sont semblables à celles de la pratique clinique d'examen TEP chez l'Homme, toutefois l'animal est anesthésié pendant l'examen d'imagerie (immobilité requise). Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience par un suivi des paramètres physiologiques (rythme respiratoire, fréquence cardiaque, etc..). Cela nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de détresse. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre les traitements appropriés.

1414- La radiothérapie est couramment utilisée pour le traitement des tumeurs cérébrales primaires et des métastases cérébrales. Cependant, elle engendre parfois des effets secondaires cognitifs ou psychologiques importants chez les patients. Des études récentes ont montré que ces effets indésirables dus aux rayonnements ionisants pourraient être en partie expliqués par une diminution de la formation de nouveaux neurones. Ce processus, appelé neurogenèse, persiste tout au long de la vie chez les mammifères au niveau de l'hippocampe et de la zone sous-ventriculaire. Il semble important dans le maintien des facultés cognitives. L'objectif de ce projet est d'étudier sur le modèle rongeur adulte les effets de la radiothérapie sur le cerveau, et plus particulièrement sur la neurogenèse, en combinant imagerie par résonance magnétique (IRM) et biologie moléculaire. Différentes modalités d'IRM permettant d'obtenir des données anatomiques, fonctionnelles et métaboliques seront déployées pour caractériser les conséquences de l'irradiation cérébrale à court terme (3 jours après irradiation), moyen terme (2 et 4 mois après irradiation) et long terme (6 mois après irradiation). Au terme de ces 6 mois, nous étudierons les marqueurs cellulaires et moléculaires de la neurogenèse sur différentes régions du cerveau, et plus

particulièrement au niveau de l'hippocampe et de la zone sous-ventriculaire afin de valider et interpréter clairement les observations IRM. Les retombées de ce projet sont majeures car il devrait permettre d'identifier des marqueurs d'imagerie prédictifs des lésions induites par les rayonnements ionisants sur le tissu cérébral sain et ainsi adapter, voire améliorer, les stratégies de traitement par radiothérapie. Bien que plusieurs études aient caractérisées in vitro les effets des rayonnements ionisants sur la neurogenèse, il est nécessaire d'évaluer ces effets sur un organisme intégré car les niches neurogéniques sont des systèmes dynamiques sensibles à leur environnement biochimique immédiat (neurotransmetteurs, facteurs de croissances, hormones...). D'autre part, les études in vitro menées sur des modèles cellulaires nécessitent également l'utilisation d'animaux pour obtenir des cellules souches neurales. Notre étude, conçue avec la volonté de respecter les règles éthiques, vise à réduire le nombre d'animaux (maximum 86 rongeurs nés et élevés en captivité, issus d'un établissement autorisé) en effectuant des suivis longitudinaux et en utilisant l'IRM, une technique d'imagerie non-invasive garantissant des données de qualité en un temps raisonnable. Toute intervention sur les animaux sera réalisée sous anesthésie, à l'aide de méthodes peu invasives. Les protocoles d'anesthésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Une visite quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer de leur bien-être. Une surveillance particulière de leur état de santé sera également mise en place par l'application d'échelles cliniques journalières et de critères d'arrêts tout au long de l'étude. Dans le cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou décider de l'euthanasie.

1415- La radiothérapie est couramment utilisée pour le traitement des tumeurs cérébrales primaires et des métastases cérébrales. Cependant, elle engendre parfois des effets secondaires cognitifs ou psychologiques importants chez les patients. Des études récentes ont montré que ces effets indésirables dus aux rayonnements ionisants pourraient être en partie expliqués par une diminution de la formation de nouveaux neurones. Ce processus, appelé neurogenèse, persiste tout au long de la vie chez les mammifères au niveau de l'hippocampe et de la zone sous-ventriculaire. Il semble important dans le maintien des facultés cognitives. L'objectif de ce projet est d'étudier sur le modèle rongeur adulte les effets de la radiothérapie sur le cerveau, et plus particulièrement sur la neurogenèse, en combinant imagerie par résonance magnétique (IRM) et biologie moléculaire. Différentes modalités d'IRM permettant d'obtenir des données anatomiques, fonctionnelles et métaboliques seront déployées pour caractériser les conséquences de l'irradiation cérébrale à court terme (3 jours après irradiation), moyen terme (2 et 4 mois après irradiation) et long terme (6 mois après irradiation). Au terme de ces 6 mois, nous étudierons les marqueurs cellulaires et moléculaires de la neurogenèse sur différentes régions du cerveau, et plus particulièrement au niveau de l'hippocampe et de la zone sous-ventriculaire afin de valider et interpréter clairement les observations IRM. Les retombées de ce projet sont majeures car il devrait permettre d'identifier des marqueurs d'imagerie prédictifs des lésions induites par les rayonnements ionisants sur le tissu cérébral sain et ainsi adapter, voire améliorer, les stratégies de traitement par radiothérapie. Bien que plusieurs études aient caractérisées in vitro les effets des rayonnements ionisants sur la neurogenèse, il est nécessaire d'évaluer ces effets sur un organisme intégré car les niches neurogéniques sont des systèmes dynamiques sensibles à leur environnement biochimique immédiat (neurotransmetteurs, facteurs de croissances, hormones...). D'autre part, les études in vitro menées sur des modèles cellulaires nécessitent également l'utilisation d'animaux pour obtenir des cellules souches neurales. Notre étude, conçue avec la volonté de respecter les règles éthiques, vise à réduire le nombre d'animaux (maximum 86 rongeurs nés et élevés en captivité, issus d'un établissement autorisé) en effectuant des suivis longitudinaux et en utilisant l'IRM, une technique d'imagerie non-invasive garantissant des données de qualité en un temps raisonnable. Toute intervention sur les animaux sera réalisée sous anesthésie, à l'aide de méthodes peu invasives. Les protocoles d'anesthésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Une visite quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer de leur bien-être. Une surveillance particulière de leur état de santé sera également mise en place par l'application d'échelles cliniques journalières et de critères d'arrêts tout au long de l'étude. Dans le cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou décider de l'euthanasie.

1416- L'objectif de ce projet est d'améliorer l'efficacité de vaccins protéiques ou peptidiques par le développement et l'évaluation de nouvelles approches augmentant l'immunogénicité (l'immunogénicité représente la capacité à déclencher la réponse immunitaire). Les stratégies de vaccination protéique ou peptidique représentent en effet des voies de choix pour tenter de protéger les populations vis-à-vis des micro-organismes infectieux ou des cancers. Cependant leur efficacité est en partie limitée par la faible immunogénicité intrinsèque des protéines, qui doivent être injectées de façon répétée et en présence d'adjuvant (un adjuvant est une substance permettant d'augmenter la réponse immunitaire) pour être efficaces. Pour pallier ces limites, notre groupe de recherche a précédemment développé trois approches améliorant l'immunogénicité. La première, qui consiste à modifier la stabilité protéique, a conduit à la production d'un nouveau candidat vaccin hautement immunogène dirigé contre le virus de l'immunodéficience humaine. La seconde et la troisième, théoriquement applicables à n'importe quel protéine ou peptide d'intérêt vaccinal, consistent, d'une part, à cibler des sucres sulfatés d'expression ubiquitaire et, d'autre part, à conférer la capacité à déclencher la réponse immunitaire en absence d'adjuvant. Nos résultats doivent maintenant être étayés par des travaux complémentaires ayant pour objectif d'évaluer si la combinaison de certaines de ces approches peut augmenter encore un peu plus l'immunogénicité, et si elles peuvent être appliquées à différents antigènes d'intérêt vaccinal. Pour évaluer ces questions, nous utiliserons des antigènes dérivés de protéines modèles, de protéines issues de microorganismes infectieux ou de protéines exprimées par des tumeurs. Les animaux étudiés (5760 rongeurs) dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés. Nous veillons à n'utiliser que le nombre minimum d'animaux nécessaire pour assurer la validité des expériences. Nous injecterons ces antigènes au rongeur modèle en présence ou en absence d'adjuvant afin d'évaluer leur pouvoir immunogénique. Le niveau et le type de réponse

immunitaire induit chez l'animal seront évalués in vitro après prélèvement de sang et/ou de certains organes lymphoïdes des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux.

1417- Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est une affection virale caractérisée par des problèmes de reproduction chez les truies et des troubles respiratoires chez les animaux en croissance. Cette maladie, apparue en Europe de l'Ouest au début des années 90, présente aujourd'hui une prévalence très élevée dans certaines régions (plus de 60% en Bretagne). Cette infection conduit à des pertes économiques considérables ainsi qu'à une utilisation importante d'antibiotiques en élevage en raison des complications bactériennes secondaires. Récemment, (2006 en Chine, puis en 2007 en Biélorussie) sont apparues des souches hautement pathogènes de virus du SDRP (SDRPv), dont le prototype est la souche dite « Lena », qui induisent des symptômes et une mortalité bien plus marquées que les souches classiques du virus. Du fait des mouvements de porcs vivants à travers l'Europe, l'introduction sur notre territoire d'une souche hautement pathogène en provenance d'Europe de l'Est représente une menace sérieuse. Parmi les mesures de lutte contre le SDRPv, la vaccination est la plus utilisée sur le terrain. Les vaccins commerciaux les plus efficaces et les plus utilisés sont les vaccins vivants atténués (MLV). Outre leur effet sur la diminution des symptômes liés à l'infection par le SDRPv, ces vaccins sont également utilisés sur le terrain pour diminuer la transmission virale au sein des élevages infectés. Actuellement, les connaissances sur l'efficacité des vaccins commerciaux MLV vis-à-vis de la souche Lena sont encore très limitées. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est donc dans un premier temps d'évaluer l'efficacité des vaccins SDRP commerciaux vis-à-vis de la souche Lena, du point de vue clinique et virologique et d'évaluer en parallèle l'innocuité et l'immunogénicité d'un nouveau vaccin MLV spécifique de la souche Lena. Dans un second temps l'efficacité vaccinale sera évaluée du point de vue de la transmission de la souche Lena. Les connaissances générées dans le cadre de ce projet pourront ainsi permettre, en cas d'émergence d'une souche hautement pathogène de SDRPv, d'utiliser la vaccination de la meilleure façon qui soit pour contrôler l'infection et sa propagation. Ce projet comporte 2 procédures. La première visera à évaluer et comparer l'efficacité de 2 vaccins commerciaux MLV vis-à-vis de la souche Lena en termes de résultats cliniques et virologiques. Elle visera également à évaluer l'innocuité et l'immunogénicité d'un nouveau vaccin MLV construit à partir de la souche Lena. Dans un second temps, le vaccin commercial qui aura montré la meilleure efficacité du point de vue clinique et virologique sera évalué quant à sa capacité à diminuer la transmission inter-porc de la souche Lena. Les paramètres virologiques seront utilisés pour estimer les paramètres de transmission dans les groupes vaccinés et non-vaccinés par modélisation mathématique. Au total 112 porcs seront utilisés dans le projet (56 pour chaque procédure). Au cours des 2 procédures, le suivi quotidien de la température et du score clinique des animaux permettra de suivre précisément l'évolution de l'infection et de recourir si besoin à une euthanasie compassionnelle si un des points limite défini est atteint.

1418- La varicelle est une maladie virale hautement contagieuse due à un herpès virus, le virus varicelle-zona (VZV). Ce virus peut provoquer la varicelle, habituellement au cours de l'enfance, mais également le zona, généralement plus tard dans la vie d'adulte. La varicelle est une maladie bénigne et spontanément résolutive chez l'enfant immunocompétent mais adopte souvent une forme plus sévère chez l'adulte. Chez l'adulte, la complication la plus courante est la pneumonie. Le VZV est présent partout dans le monde et, en l'absence de programme de vaccination, la plupart des individus sont infectés avant d'atteindre la moitié de leur vie. Le virus pénètre chez l'hôte par les voies respiratoires supérieures ou la conjonctive. Après l'infection primaire, le virus reste dormant dans les ganglions nerveux sensoriels et peut se réactiver ultérieurement en provoquant un zona. Selon l'OMS, le taux de mortalité en 2010 était d'environ 3 décès pour 100000 cas dans les pays à revenus élevés. Environ 4,2 millions de cas de complications sévères entraînant une hospitalisation et 4200 décès seront relevés dans le monde pour l'année 2014. Dans les années 1990 des vaccins ont été élaborés et commercialisés. Différents calendriers de vaccination ont été étudiés pour obtenir la meilleure efficacité de prévention. L'objectif de ce projet est de caractériser la réponse immunitaire induite par le vaccin Varilrix, utilisé chez l'homme depuis 2004, et de la comparer à celle induite par d'autres candidats vaccins. Il comprend plusieurs étapes : la mise au point du modèle expérimental (vaccination et caractérisation de la réponse immunitaire mise en place) puis l'évaluation de l'efficacité de la réponse immune induite par le vaccin contre une infection expérimentale par le VZV. Les essais de protection par des vaccins ne peuvent être réalisés que sur des organismes entiers vivants : aucun modèle cellulaire ou numérique ne peut reproduire la complexité d'une réponse immunitaire. Le modèle animal choisi pour ce projet est le primate non humain (PNH) afin d'avoir, d'une part, une réponse vaccinale similaire à la réponse humaine et, d'autre part, un modèle d'infection par le VZV comparable à la maladie humaine, uniquement d'un point de vue systémique car aucun signes cliniques ne sont détectables chez le macaque cynomolgus après infection par le VZV humain. Au maximum 28 animaux nés et élevés dans des élevages agréés seront inclus dans le projet. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour interpréter les résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (limitation des volumes prélevés, prélèvements sous anesthésie). Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination), le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires ou en modules individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1419- Les maladies du système nerveux (Alzheimer, Parkinson, Huntington...) et les autres altérations cérébrales liées à l'âge sont une préoccupation croissante en santé publique. La maladie d'Alzheimer (MA) est une affection neurodégénérative

caractérisée par différentes lésions, notamment la présence de plaques séniles (amyloïdose) liées à l'accumulation de protéine β -amyloïde ($A\beta$). Nous souhaitons aujourd'hui poursuivre la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer. Depuis quelques années, un lien entre la MA et les maladies à prions (encéphalopathies spongiformes) a été établi. L'hypothèse d'une origine « Prion » de la maladie d'Alzheimer repose sur des similitudes entre les deux types de pathologie. Le prion anormal transmet, par simple contact, sa mauvaise conformation à ses voisins normaux. Or, en 2006, pour la première fois, une équipe a montré, par injection d'homogénats de cerveaux contaminés par des dépôts amyloïdes, que l'amyloïdose est expérimentalement transmissible. De nombreuses lignées de rongeurs transgéniques reproduisent partiellement les lésions cérébrales caractéristiques de la MA, notamment les dépôts extracellulaires de peptide $A\beta$. Cependant, ces modèles sont encore très imparfaits. Dans cette étude, nous nous concentrerons principalement sur les mécanismes de nucléation-propagation de type prion de l'agrégation du peptide amyloïde- β . L'objectif de ce projet est de développer des modèles rongeurs par une approche basée sur l'administration intracérébrale d'homogénats de tissus humains atteints par la maladie d'Alzheimer. Pour cela, nous allons utiliser 4 modèles rongeurs afin d'évaluer l'influence de la présence de mutations et/ou le niveau d'expression de la protéine β -amyloïde ainsi que la présence ou non de certaines enzymes humaines mutées liées au métabolisme de cette protéine. Nous espérons mieux comprendre, grâce à cette étude, l'apparition des plaques amyloïdes dans le cerveau de rongeur (phénomène de nucléation) et leur dissémination (phénomène de propagation). Nous développerons également des techniques d'imagerie IRM longitudinales pour observer l'évolution des plaques amyloïdes afin d'éviter l'euthanasie d'animaux en cours de projet. Cela permettra en particulier de comparer cette apparition/dissémination à celle observée chez l'Homme. Le recours à l'animal est nécessaire car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et ont été élevés en captivité dans des établissements reconnus. Leur nombre (400) a été réduit au minimum nécessaire pour valider statistiquement les nouvelles méthodologies sous différentes conditions. Les procédures expérimentales consistent en des analyses d'imagerie et des injections intracérébrales ou intra-cisternales. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés pour cette espèce depuis de nombreuses années par un vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi permettent de garantir leur bien-être.

1420- L'arthrose est la pathologie rhumatologique la plus fréquente chez l'humain. Elle se caractérise par la dégradation du cartilage (os et cartilage) se traduisant cliniquement par des douleurs et une gêne fonctionnelle de l'articulation touchée. Des travaux récents ont montré le rôle de l'interleukine 6 (IL-6) dans la dégradation de cartilage observée lors de l'arthrose. L'Interleukine pourrait être une cible intéressante dans l'arthrose. Les expérimentations *in vitro* sur des cellules du cartilage suggèrent que l'inhibition de l'IL6 diminuerait la synthèse des enzymes responsables de la dégradation du cartilage. L'influence de la composante mécanique étant fondamentale, les données *in vivo* sont donc indispensables pour l'analyse complète du rôle de l'IL-6. Il apparaît que l'induction d'une arthrose chez la souris peut reproduire la pathologie sur l'ensemble des tissus. Cette induction consiste à pratiquer une ménisectomie (ablation chirurgicale d'un ménisque) sur le genou droit (procédé validé par la saisine CEEALV/2009-12-01). Dans le but de démontrer l'implication de l'IL-6 dans l'arthrose, nous nous proposons d'inhiber son activité *in vivo* à trois niveaux différents : premièrement en inhibant partiellement l'effet intra-cellulaire de l'IL6 (Stattic), deuxièmement en inhibant totalement l'effet principal de l'IL-6 dans la cellule (Tofacitinib), et enfin en inhibant toutes les activités de l'IL-6 (MR-16.1). Pour ce faire, nous effectuerons des expérimentations sur 5 groupes de 12 souris mâles de souche C57Bl/6 chacun. Les souris des cinq groupes seront ménisectomisés sur le genou droit. Un groupe sera traité avec Stattic par voie orale, un deuxième sera traité par le Tofacitinib par voie intra-péritonéal (IP), et le troisième avec le MR-16.1 en IP. Les deux derniers seront les contrôles, soit gavés avec du PBS, soit injectés par du PBS (solution saline). Les résultats obtenus nous permettront de mieux comprendre le rôle de l'IL-6 au cours de l'arthrose et de déterminer de futures cibles thérapeutiques. L'ensemble de la procédure concernera 60 souris sur une période maximale de 2 ans. Afin de réduire à son maximum le nombre d'animaux participants sans compromettre l'obtention de résultats exploitables, nous aurons pratiqué la ménisectomie sur un seul des genoux de la souris, l'autre servant de contrôle. L'animal sera ainsi son propre témoin. Pour chaque souris, une injection permettant le traitement de la douleur (la Buprenorphine, molécule opiacée) sera faite 15 mn avant chaque intervention chirurgicale, laquelle sera pratiquée sous anesthésie générale, en injection intra péritonéal, (Kétamine (160 mg/kg) et de Xylazine (5 mg/kg IP). Six heures plus tard, nous procéderons à une nouvelle injection de d'anti douleur. Si une modification du comportement (prostration, perte de poids plus 20%, hypoactivité) de l'animal est constatée, des injections supplémentaires de ce médicament, à raison d'une toutes les 12 heures seront réalisées. Une surveillance des souris sera ensuite effectuée 3 fois par semaine. Tout signe tel que perte de poids, prostration... constaté fera l'objet d'une analyse afin de déterminer le traitement le plus approprié au rétablissement de l'animal. Si aucun des moyens dont nous disposons pour améliorer son état de santé s'avéraient satisfaisants, nous procéderions alors à sa mise à mort.

1421- L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe 4 formulations d'extraits naturels (la dénomination de ces extraits est sujette à accord de confidentialité) permettant de réduire des facteurs de risques associés à certains troubles de santé liés au métabolisme. Ainsi, le principal objectif de la présente étude est d'évaluer la biodisponibilité plasmatique et l'élimination urinaire et fécale de métabolites présents dans les différents extraits chez un modèle de souris sauvages. A terme, les données obtenues au cours de l'étude devraient permettre à la société cliente de commercialiser des extraits naturels améliorant chez l'homme un mauvais état de santé ou d'autres anomalies liées au métabolisme. Les 4 formulations à tester contiennent 10 métabolites d'intérêt identiques,

en concentrations différentes. L'étude sera conduite en deux phases successives : Une phase d'étude préliminaire ayant pour objectif de valider la faisabilité du dosage des 10 métabolites d'intérêt dans le plasma, l'urine et le contenu caecal de souris et de définir la dose unique à employer dans la phase d'étude complète. De façon à limiter le nombre d'animaux utilisés, cette étape préliminaire sera menée sur une seule formulation, administrée per os (gavage oral) à 3 doses différentes, et limitée à un seul temps de prélèvement post-administration (n=3/dose). Un groupe de 3 animaux supplémentaires sera utilisé afin de réaliser des prélèvements de sang, d'urine et du contenu caecal en l'absence de traitement, de façon à s'assurer que les métabolites d'intérêt ne soient pas détectables dans ces matrices à l'état basal. Cette étape préliminaire nécessitera donc un total de 12 animaux : 3 doses X 3 animaux (T2h) + 3 animaux (T0-Basal). Une phase d'étude complète concernant les 4 formulations, avec 8 temps de prélèvements post-administration (T0.5h, T1h, T2h, T4h, T6h, T8h, T12h et T24h). Compte tenu des volumes plasmatiques nécessaires au dosage des 10 métabolites d'intérêt (au moins 250µl de plasma) et du besoin de récupération du contenu caecal, il sera nécessaire d'utiliser un groupe de souris pour chacun des 5 temps post-administration (n=5 par temps) et pour chacune des formulations. Comme pour la phase préliminaire, des prélèvements d'urine et du contenu caecal seront réalisés sur les mêmes animaux après une administration per os (gavage oral) des formulations. L'étude complète nécessitera ainsi l'utilisation d'un total de 160 animaux : 4 formulations x 8 temps de prélèvement x 5 animaux par temps. L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution in vitro permettant l'étude de la biodisponibilité de composés naturels dans le plasma, et de leur élimination urinaire et fécale. Le modèle animal envisagé est un modèle souris sain (souche C57Bl/6). L'intégralité de la présente étude de biodisponibilité nécessitera un total de 172 souris (12 pour la phase préliminaire + 160 pour l'étude complète). Bien que les procédures prévues soient très peu invasives, des mesures seront prises afin réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées. Ainsi, les souris seront hébergées collectivement dans des cages équipées d'igloo et de matériel permettant de confectionner un nid. Par ailleurs, les souris seront habitués pendant 14 jours à la manipulation par les expérimentateurs et pendant 7 jours aux procédures d'administration par gavage oral avant l'expérimentation proprement dite.

1422- Le but de ce projet consiste à développer des nanoparticules ultra-brillantes pour de l'imagerie non invasive de fluorescence. Cette nouvelle technique en plein essor permet d'imager un processus biologique tel que la croissance tumorale jusqu'à quelques centimètres de profondeur dans les tissus et ceci de façon non radiative, avec une méthode simple à mettre en œuvre et des équipements peu coûteux. Nos travaux précédents montrent que ces nanoparticules de nature lipidique sont très bien tolérées par les cellules en culture et par les rongeurs après une injection intraveineuse. Leur taille nanométrique leur permet de traverser les pores de la nouvelle vascularisation dans l'environnement tumoral et de s'accumuler ainsi dans les tumeurs. Ces propriétés ne peuvent être observées qu'in vivo chez des rongeurs présentant des tumeurs induites expérimentalement et il n'existe pas de modèle in vitro de substitution pour ces études. Par ailleurs, les nanoparticules peuvent être fabriquées en incorporant à leur surface un ligand particulier permettant d'accroître leur sélectivité pour les cellules tumorales. Les nanoparticules offrent de plus une opportunité unique de développer des agents de contraste d'imagerie pour plusieurs modalités, comme l'imagerie de fluorescence et l'imagerie nucléaire. En effet, l'imagerie nucléaire permettrait de détecter sur corps entier une zone anormale comme une masse tumorale et l'imagerie de fluorescence permettrait d'assister le geste du chirurgien pour la retirer. Ceci pourrait être réalisé en ayant recours au même traceur nanoparticulaire. Dans ce projet, nous nous proposons donc de développer des nanoparticules multimodales en imageries de fluorescence et nucléaire et de tester leurs propriétés d'accumulation dans un modèle animal de tumeurs implantées dans le dos de souris. L'accumulation des particules dans les tumeurs sera évaluée par imagerie non invasive de fluorescence, permettant ainsi un suivi longitudinal des mêmes souris et de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les études (< 5 animaux par groupe expérimental). En outre, les animaux, au nombre de 42, seront suivis quotidiennement dans la phase de croissance tumorale et un point limite a été fixé pour sortir du protocole les animaux présentant une douleur avérée ou ayant subi une perte trop importante de masse corporelle. Le recours systématique à des anti-inflammatoires ou des analgésiques n'est pas permis dans la mesure où cela pourrait interférer avec la croissance tumorale. Toutefois, certains analgésiques pourront être administrés pour les cas les plus proches du point limite. En résumé, tous les efforts seront mis en œuvre par les expérimentateurs pour réduire la douleur et l'inconfort des animaux selon les recommandations en vigueur, en respectant la règle des 3R.

1423- Des données récentes suggèrent que plus de 30.000 Britanniques pourraient être porteurs sains de la souche de prion responsable de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, ce qui pourrait se traduire par au moins 1000 poches de sang à risque chaque année. En France, les prévalences attendues sont 10 fois inférieures. L'évaluation du risque sanguin lié aux prions reste donc nécessaire pour anticiper d'éventuels nouveaux cas transfusionnels de cette maladie neurodégénérative. Le test actuel consiste à exposer des rongeurs aux produits sanguins. Or beaucoup d'animaux traités avec des produits provenant de donneurs infectés ne présentent aucune accumulation cérébrale de PrPres (la forme pathologique de la protéine du prion), phénomène considéré comme le marqueur spécifique de la maladie. Ces animaux sans PrPres présentent cependant des signes neurologiques similaires aux autres, avec des périodes d'incubation comparables. De plus, il a été montré en 1997 que des extraits de cerveau de tels animaux (exposés à l'agent de l'ESB et présentant des signes neurologiques mais n'accumulant pas de PrPres) est contaminant. Au cours de passages successifs (ré-inoculation d'extraits de cerveau de rongeur à rongeur), la PrPres est apparue chez les animaux receveurs, jusqu'à être présente chez tous au bout de 4 à 5 passages successifs. Ainsi, dans certaines conditions défavorables à l'infection (faibles doses, forte barrière d'espèce par exemple), les maladies à prion pourraient être transmises sans que les marqueurs diagnostiques spécifiques soient présents. En d'autres termes, la PrPres pourrait être considérée comme un marqueur de virulence. Afin de montrer que le prion est bien responsable des troubles neurologiques observés sur les animaux décrits précédemment, il est nécessaire de réaliser des études de retransmission de

rongeur à rongeur pour confirmer, d'une part, le caractère transmissible de la maladie et, d'autre part, l'apparition de PrPres dans le cerveau des animaux receveurs. Aucun modèle alternatif *in vitro* (amplification en milieu acellulaire ou modèle cellulaire) n'est disponible à ce jour pour mettre en évidence ces deux phénomènes. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous proposons de réaliser ces études de retransmission à partir d'un faible nombre d'échantillons représentatifs (cerveaux de souris inoculés par les produits sanguins infectés, qui développent des signes cliniques mais pour lesquelles il n'y a pas de PrPres détectable). La présence de PrPres chez quelques animaux receveurs suffira pour étayer la démonstration, sans nécessiter des passages successifs jusqu'à la présence de PrPres chez tous les receveurs. Afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs, nous prévoyons d'utiliser 560 rongeurs nés et élevés dans des établissements agréés. Après inoculation des échantillons à tester par voie intracérébrale, les rongeurs seront surveillés cliniquement tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. A l'installation de signes neurologiques évidents, les animaux seront euthanasiés et la présence de PrPres sera recherchée dans leur cerveau par des techniques biochimiques et histologiques.

1424- La consommation excessive d'alcool est la première cause de cirrhose en France.

L'atteinte hépatique débute par une stéatose (accumulation de triglycérides dans les hépatocytes) qui peut évoluer en hépatite alcoolique durant l'abus d'alcool. La maladie peut ensuite évoluer vers la fibrose jusqu'à la cirrhose et le cancer du foie. La mortalité des formes sévères de l'hépatite alcoolique est comprise entre 50 et 75%. La corticothérapie est le seul traitement qui peut améliorer le pronostic à court terme. D'autres facteurs que la seule consommation excessive d'alcool interviennent dans la genèse des lésions hépatiques. Ainsi, parmi les sujets ayant une forte consommation d'alcool à long terme, la majorité des patients développent une stéatose, mais seulement 10 à 35% développeront une inflammation (hépatite) et 8 à 20% évolueront vers la cirrhose. La recherche de facteurs qui relient consommation d'alcool, nature et progression des lésions hépatiques est donc essentielle pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques améliorant la prise en charge de ces formes graves. Nous avons récemment montré que le microbiote intestinal (bactéries présentes dans notre tube digestif) participe à la survenue des lésions hépatiques au cours de l'alcoolisation. En effet, nous avons d'une part, montré le rôle aggravant de bactéries du groupe des Clostridia et inversement le rôle protecteur du groupe des Bacteroides. Des transferts de microbiote ainsi qu'un traitement à la pectine ont permis de maintenir des proportions élevées de Bacteroides et de prévenir l'apparition des lésions hépatiques chez des souris alcoolisées. Notre projet vise à étudier plus en détails le rôle protecteur des Bacteroides dans le développement des lésions hépatiques et d'identifier au sein du groupe quelles bactéries en particulier médient ces effets protecteurs. Ceci en vue de développer des traitements probiotiques. Nous allons également déterminer les conditions optimales de traitements prébiotiques à base de pectine pour une protection maximale du développement des lésions hépatiques. Les souris ayant une aversion naturelle pour l'alcool, le modèle d'alcoolisation que nous utilisons consiste à nourrir les souris avec un régime semi-liquide enrichi en graisses et supplémenté en alcool ou non. Ce régime sera en fonction de nos conditions additionnée de pectine en quantités et de provenance différentes ou associé à une transplantation de microbiote. Les atteintes hépatiques seront évaluées afin de déterminer l'impact du traitement sur la maladie. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous tenons compte de la règle des 3R (Réduction, raffinement et remplacement) pour déterminer la taille des groupes. De ce fait, les groupes de souris sont élaborés afin de minimiser le nombre d'animaux tout en gardant des groupes permettant d'obtenir des résultats interprétables statistiquement. Au total ce projet nécessite l'utilisation de 326 souris. Pour chaque procédure et durant toute la période d'hébergement, nous veillons au bien être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'angoisse et la détresse subies par les animaux, en particulier, en enrichissant les cages avec des rouleaux en cartons et un morceau de bois à ronger.

1425- Le système vasculaire lymphatique joue un rôle important dans le drainage des liquides interstitiels et le transport des cellules du système immunitaire. Les vaisseaux lymphatiques participent également au drainage des tumeurs et constituent l'une des voies par lesquelles les cellules tumorales peuvent s'échapper et coloniser des tissus à distance. Nous venons de mettre en évidence un rôle crucial d'un facteur de croissance, la protéine BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9), dans la maturation du réseau vasculaire lymphatique et la formation des valves des vaisseaux collecteurs lymphatiques. Un impact fonctionnel de la déficience en BMP9 sur l'efficacité du drainage lymphatique a pu être observé en parallèle, par une étude d'imagerie non invasive. La question se pose maintenant de connaître l'implication éventuelle de ce facteur circulant dans la progression tumorale, puisque les vaisseaux lymphatiques constituent une voie majeure de dissémination des cellules métastatiques vers les ganglions lymphatiques. Cette étude vise à approfondir la compréhension du rôle de BMP9 et de son récepteur membranaire ALK1 dans la régulation de la lymphangiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques) tumorale et la dissémination de métastases. Cette étude utilisera des rongeurs normaux et des rongeurs privés de BMP9 par invalidation génique, chez lesquels seront induites des tumeurs de type mélanome. A l'aide de ce modèle, nous analyserons le développement du réseau vasculaire lymphatique de la tumeur et des ganglions lymphatiques « sentinelles » (les plus proches de la tumeur), ainsi que l'invasion de ces derniers par les cellules tumorales. Nous analyserons, en particulier, si des anticorps bloquants et des molécules connues pour cibler la voie de signalisation BMP9/ALK1, peuvent présenter un intérêt pour interférer avec ces processus. Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations, importantes pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-tumorales. Le recours à des investigations *in vivo* est donc nécessaire. Le modèle rongeur a été choisi pour réaliser cette étude. Les animaux sont nés et ont été élevés dans un établissement agréé. Leur nombre (120) a été déterminé sur la base des données de la littérature et pour répondre aux exigences d'un test statistique (test t de Student) qui sera appliqué pour chaque expérience. Ainsi, nous veillons à n'utiliser que le minimum

nécessaire d'animaux pour assurer la validité des résultats. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

1426- Les essais cliniques de thérapie génique pour l'amaurose congénitale de Leber induite par les mutations du gène RPE65 ont ouvert la voie à des applications plus larges de ce type de stratégie pour les rétinites pigmentaires. Ces essais cliniques, tous basés sur l'injection sous-rétinienne de vecteurs AAV (vecteur viral adéno-associé), montrent cependant des limites, en particulier au niveau de l'électrorétinogramme qui permet de mesurer de manière objective la fonction rétinienne. Bien qu'il soit nettement amélioré dans les modèles animaux, ce n'est pas le cas chez les patients. Cela justifie la proposition d'un autre type d'outil thérapeutique. Nous avons démontré que les vecteurs lentiviraux dérivés de HIV-1 sont très efficaces pour introduire des séquences génétiques dans des cellules de l'épithélium pigmenté rétinien, permettant ainsi la sauvegarde des cônes dans des modèles murins de déficience en RPE65. Nous poursuivons maintenant nos démarches pour la validation de ce type de vecteur chez le modèle primate. Le vecteur lentiviral présente en effet plusieurs avantages sur le vecteur AAV pour une application dans l'amaurose congénitale de Leber : il cible spécifiquement les cellules de l'épithélium pigmenté, limitant ainsi la diffusion du vecteur ; il a une plus grande capacité de clonage, ce qui permet d'utiliser le promoteur du gène RPE65 ; enfin, c'est un vecteur intégratif, garantissant ainsi une expression à long terme du transgène. L'objectif de ce projet est de tester un lot préclinique du vecteur lentiviral porteur du gène RPE65 (LV-RPE65) pour démontrer son innocuité après administration sous-rétinienne sur des primates non humains en évaluant la réaction inflammatoire et immunitaire éventuelle après l'injection du vecteur. Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules de la rétine, en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules. Chez l'homme, la vision des couleurs à haute acuité est assurée par la partie centrale de la rétine, dénommée macula. Cette région est particulièrement sensible et n'existe que chez les primates. Il est donc nécessaire de recourir à ce modèle pour vérifier la toxicité éventuelle d'un vecteur viral administré par voie sous-rétinienne. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et ont été élevés dans des établissements reconnus. Leur nombre (5) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données suffisantes afin de valider les nouvelles méthodologies sous différentes conditions. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standardisés en élevage et le suivi quotidien des animaux, hébergés en groupe dans un milieu enrichi, permettent de garantir leur bien-être.

1427- La fonction de reproduction est une des premières à se mettre en place, très tôt au cours de la vie fœtale, et une des dernières à devenir fonctionnelle, à partir de la puberté. La mise en place de la gamétogenèse fœtale permet l'établissement d'un stock de spermatogonies souches et d'ovocytes, respectivement précurseurs des gamètes matures mâles et femelles. Toute altération qualitative ou quantitative du développement de la lignée germinale risque d'avoir des répercussions qui ne se révéleront que très tardivement sur la fertilité de l'individu adulte. Paradoxalement, bien que cette période présente une vulnérabilité accrue à de nombreux perturbateurs, les mécanismes fondamentaux contrôlant le développement des cellules germinales fœtales humaines ne sont que très partiellement élucidés, et les mécanismes d'actions des perturbateurs chimiques ou physiques sont encore très largement méconnus à ce stade. Afin de mieux caractériser les acteurs impliqués dans la différenciation des cellules germinales fœtales humaines, et de mettre en évidence la reprotoxicité de différents agents environnementaux, nous utiliserons un modèle de xénogreffe de gonades fœtales humaines mâles et femelles, modèle qui autorise le développement à "long terme" de ces organes. Les gonades seront greffées dans le dos de souris immunodéficientes. Avec ce modèle, déjà caractérisé par d'autres équipes de recherche, il nous sera possible d'exposer les gonades fœtales humaines à différents agents pendant plusieurs semaines tout en autorisant la différenciation physiologique de la gonade. Les objectifs de ce projet sont donc : i) de mettre en évidence de nouveaux acteurs impliqués dans la différenciation des cellules germinales humaines et ii) d'évaluer la reprotoxicité de divers polluants environnementaux, notamment des perturbateurs endocriniens. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet (256 animaux au maximum) sont nés et ont été élevés dans des établissements reconnus. Le projet portant sur le développement normal et altéré des gonades humaines à moyen et long terme, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou informatique. En effet, les modèles *in vitro* ne permettent pas la survie de ce tissu ni son développement au-delà de quelques jours, alors que l'effet chronique de perturbateurs chimiques doit être évalué sur plusieurs mois. Cette approche, directement sur un tissu humain (bien que greffé dans un modèle rongeur), devrait par ailleurs permettre de limiter le recours à un modèle primate, seule alternative existante. Ce modèle est également une alternative à la création d'animaux transgéniques complexes (mutants conditionnels ou inductibles) pour l'étude de gènes impliqués dans le développement des cellules germinales. Le nombre d'animaux prévu pour ce projet a été réduit au minimum garantissant la validité statistique et l'utilité des expériences qui seront menées. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux, dont l'état de santé sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de stress ou de souffrance. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Ce projet est prévu sur une durée maximale de 5 ans ; au cours de cette période les expériences seront menées progressivement et tout protocole induisant un stress ou une souffrance inattendue lors des premières expérimentations sera arrêté.

1428- Le chordome est une tumeur rare, de pronostic péjoratif à moyen terme avec une médiane de survie d'environ 6 ans. Les chordomes sont localisés le plus souvent au niveau de la base du crâne, du rachis cervical et du sacrum, associé aux

tuniques entourant le système nerveux. Les localisations sacrées sont volontiers volumineuses, plus de 15 cm de diamètre. Ces tumeurs sont molles et n'envahissent que modérément les structures voisines. Les localisations de la base du crâne sont plus petites, découvertes plus tôt, car ce traduisant par des symptômes neurologiques. Le traitement standard est la neurochirurgie, avec l'ablation la plus complète possible suivie de hautes doses de radiothérapie. Il n'y a, à ce jour, aucune chimiothérapie ou biothérapie efficace et standardisée. Des études de biologie tentent d'identifier à partir des voies de signalisations impliquées dans la progression des chordomes, de nouvelles cibles thérapeutiques avec quelques pistes encourageantes. Une analyse immuno-histochimique sur 287 chordomes a mis en évidence dans 86% des cas, une expression du VEGF (vasculaire endothelial growth factor), dont la voie de signalisation est une cible potentielle bien connue pour des thérapies ciblées. L'utilisation de modèles précliniques est indispensable pour tester ces nouvelles cibles, puisque la rareté de ce cancer interdit de faire des études chez l'homme avec suffisamment de patient pour tester les différentes thérapies ciblées. Peu de lignées cellulaires ont été développées et semblent peu représentative de la maladie. Les modèles murins obtenus par xéno greffe de lignées cellulaires ou par implantation directe de tumeurs primaires sont encore peu développés dans le cas des chordomes et seule une équipe, a mis au point un modèle primaire de xéno greffe. La première étape de ce projet de recherche consiste donc à développer des modèles de xéno greffe primaire de chordome. Pour cela des souris recevront une prémédication, puis sous anesthésie recevront des fragments de tumeurs humaines posés sur le sacrum, et dans le flanc. Une analgésie postopératoire sera donnée, puisque l'os du sacrum aura été ouvert pour que la tumeur puisse toucher une tunique ce qui devrait augmenter les chances de prise de la greffe. Pour valider un modèle, il faut obtenir sa validation par son entretien, c'est à dire la greffe en série et que l'analyse avec les tumeurs initiales sur le plan histologique, génomique et moléculaire valide sa similitude. La comparaison des croissances entre le site sous cutané et celui en regard du sacrum permettront de mieux comprendre comment grandissent ces tumeurs. Il faut en effet un site particulier pour qu'une tumeur puisse grandir, en contact avec des tissus particuliers. Les modèles établis n'utiliseront que les greffes en regard du sacrum et non les greffes sous cutanées. Ces modèles de xéno greffe permettront ainsi de mieux comprendre les mécanismes de la tumorigénèse des chordomes, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques puis le test de nouveaux traitements. Nous utiliserons 3 souris à chaque tentative de greffe avec une nouvelle tumeur. Une dizaine de chordomes seront greffés. Le but est d'obtenir au moins 3 xéno greffes stable, c'est à dire qui puissent être greffées de souris en souris pour avoir du tissu vivant. passage d'un modèle. Nous pensons tester 10 tumeurs. En émettant l'hypothèse que 5 puissent prendre, et de réaliser de 2 à 4 passages par an, nous utiliserons souris immunodéprimées au maximum pendant la durée du projet de 5 ans si la congélation n'est pas possible. Si celle ci est possible, les tumeurs seront congelées entre les expérimentations thérapeutiques. Donc 5 tumeurs X 3 en échec = 15 animaux. 5 en succès = 15 pour la greffe et 50 par an pour entretenir les modèles. Nous utiliserons donc au maximum 300 souris immunodéprimées pendant la durée du projet. Idéalement la tumeur de deuxième passage qui a la croissance la plus active permet de refaire la greffe et la deuxième tumeur est utilisée pour faire un scanner. L'aspect au scanner de la tumeur sera comparé à celui du scanner de la tumeur pour le patient ce qui permet de valider la greffe par une comparaison des images. Afin de veiller au bien-être des animaux, une visite en fin de journée et le lendemain matin de l'intervention (greffe de tumeur) seront réalisées par l'expérimentateur. Cette visite aura pour but de vérifier l'état général des animaux (gêne respiratoire, modification du rythme cardiaque, mobilisation...). Après les 2 premiers jours, la surveillance sera bi hebdomadaire par l'expérimentateur et par l'animalier. Un suivi journalier n'est pas nécessaire dans notre expérience des xéno greffes. En cas de modification de l'état général des animaux, l'expérimentateur sera informé et une décision sera prise dans la journée. En cas de signes de souffrance des animaux (anorexie, perte de poids > 20%, altération de l'apparence physique (grattage, poil terne,...) et du comportement (repli dans un coin, poil hérissé,...) ou de leur capacité à bouger, à ce mobiliser, ils seront mis à mort considérant qu'il s'agit d'une complication post-opératoire, ou d'un point limite, et ce même si la tumeur n'est pas encore assez grosse pour faire une nouvelle greffe. Le passage à l'animal reste nécessaire car il permet de voir l'effet d'un traitement dans un système intégré et de cette façon, pouvoir recréer les conditions les plus similaires possibles à la condition humaine. Dans les maladies rares il est impossible de tester toutes les stratégies sur les patients.

1429- L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe des composés thérapeutiques dans le domaine du diabète. L'objectif de l'étude est double : - évaluer les effets d'un traitement subchronique (10,5 jours) par un composé X (la dénomination du composé est sujette à confidentialité) sur la prise alimentaire, le poids corporel, la glycémie et l'incidence d'éventuels effets secondaires. -évaluer les effets d'un traitement de deux jours sur le comportement de pica afin de vérifier si le composé en question est susceptible d'entraîner un malaise gastrique. Le comportement de pica correspond chez le rongeur à la consommation préférentielle d'une substance basique non nutritive (kaolin), au détriment d'une alimentation standard. Ce comportement est attribué à la nature basique du kaolin dont la consommation permettrait ainsi de calmer cet état de nausée/malaise gastrique. L'étude du comportement de pica permet ainsi de différencier, chez le rongeur, les effets spécifiques de réduction de la prise alimentaire et les effets aversifs de type nausée/malaise gastrique. Le paradigme expérimental a été conçu en appliquant au mieux la règle des 3R: -Raffinement: Le protocole est très peu invasif et ne génère que très peu de stress, de souffrance et d'angoisse chez les animaux. Néanmoins, ces derniers critères seront mesurés quotidiennement à l'aide d'une table de score éprouvée. - Réduction: Ce type d'études est mené en routine et le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de résultats obtenus lors d'études antérieures. Le nombre de 8 animaux par groupe a été défini comme le nombre minimum d'animaux à utiliser pour pouvoir mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés. -Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de comportements tels que la consommation alimentaire, la prise

hydrique, la glycémie et le comportement de pica. Ces études seront menées sur un modèle de souris ob/ob, obèse et diabétique, qui est particulièrement bien documenté dans la littérature comme modèle d'étude préclinique dans le développement de composés à visée anti-obésité ou antidiabétique. Le choix du modèle souris a été validé avec le client. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de détailler les mécanismes d'action de leur composé. Un total de 48 souris ob/ob sera utilisé, divisé en 6 groupes de 8 animaux : - deux de ces groupes seront utilisés afin de mesurer l'impact d'un traitement de 10,5 jours avec le composé X par voie intrapéritonéale (ip) sur le poids corporel, la prise alimentaire, la glycémie et l'incidence d'éventuels effets secondaires (Groupe composé X, Groupe véhicule). - quatre de ces groupes seront utilisés afin de mesurer l'induction éventuelle d'un malaise gastrique après deux jours d'administration ip ou per os (po) (Groupe composé X ip, Groupe véhicule ip, Groupe composé X po, Groupe véhicule po)

1430- Le diagnostic et le traitement de la maladie d'Alzheimer sont deux défis majeurs de santé publique aujourd'hui. Bien que la maladie soit bien caractérisée, notamment avec l'observation de l'agrégation de la protéine Tau dans les cellules neuronales, ses causes restent inconnues. L'agrégation toxique de la protéine Tau pourrait être utilisée comme index de progression de la maladie. Nous proposons de générer un nouveau modèle d'agrégation de cette protéine chez le rat par transfert de gène. Nous caractériserons d'abord l'effet de la surexpression de Tau dans le cerveau sur la mémoire, le métabolisme du cerveau et l'intégrité de ses cellules. Nous analyserons ensuite la correspondance entre l'état d'agrégation de Tau et le signal produit par des agents d'imagerie décrits comme spécifiques de Tau. Notre étude décrira un modèle animal sur lequel tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Elle déterminera quelle est la cible des traceurs d'imagerie actuels et contribuera à mieux exploiter ainsi les examens d'imagerie. Ce modèle aidera au développement de nouveaux traitements et à un meilleur dépistage de la maladie. Le recours au modèle rongeur est ici nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages reconnus. Leur nombre (260) a été réduit au maximum tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

1431- La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire caractérisée par des déficits cognitifs, psychiatriques et des troubles moteurs. En France, la maladie touche environ 1 personne sur 10 000 et aucun traitement efficace n'est actuellement disponible pour guérir ou ralentir sa progression. Un consortium européen, Repair-HD, a pour objectif de mener des recherches cliniques et précliniques pour proposer une thérapie cellulaire ainsi que des méthodes d'évaluation fonctionnelle directement applicables aux patients à la fin du projet. Dans ce cadre, il est indispensable de réaliser un essai préclinique chez un modèle primate non-humain de la MH afin d'évaluer la sécurité et l'efficacité de différents types de cellules souches et la réaction du système immunitaire. Cette étude préclinique s'inscrit dans une démarche translationnelle et est requise pour élaborer un dossier réglementaire à fournir aux autorités compétentes avant le démarrage d'un essai clinique. Les études chez le primate non-humain sont indispensables afin de déterminer le protocole neurochirurgical d'implantation de cellules et le suivi en imagerie non-invasif le plus pertinent chez le patient. De plus, le modèle primate se justifie par la possibilité d'évaluer les fonctions cognitives et motrices dans une espèce proche de l'homme qui puisse prédire l'efficacité de la thérapie cellulaire chez le patient. Les 21 animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données suffisantes afin d'évaluer l'effet du traitement. L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques indolores et non-invasives telles que l'imagerie et le comportement. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Un suivi clinique régulier et l'application de critères d'arrêt permettront de veiller au bien-être des animaux.

1432- Les avancées établies en recherche en cancérologie ont démontrés que l'évolution de la maladie est plus complexe qu'initialement présumé. L'instabilité génétique des cellules cancéreuses leur confère notamment une capacité d'adaptation aux contraintes de l'environnement en entraînant une émergence rapide de phénotypes résistants ou invasifs. Dans le but de combattre ces phénomènes de résistance, il convient de développer des moyens de traitement plus efficaces. Dans ce contexte, la thérapie adaptative, dont l'approche est l'ajustement des thérapies au cours du traitement et leur combinaison, apparaît être un moyen efficace de combattre les formes de cancer les plus résistantes. Cependant, à cause de la complexité du processus de développement tumoral pendant un traitement, il reste difficile de d'adapter les dosages et de combiner efficacement les différentes thérapies. Une approche intégrative, telle que le permet la modélisation théorique, est aujourd'hui plus que nécessaire pour rationaliser et optimiser l'usage des traitements thérapeutiques existants. Dans ce contexte, nous avons développé un projet de stratégie thérapeutique assistée par ordinateur qui a pour objectif d'utiliser la modélisation computationnelle pour guider le traitement d'une tumeur sous-cutanée. L'ambition de ce projet est de proposer à terme un logiciel assistant les cliniciens dans leur choix quant à la prise de décision concernant un patient. Dans ce cadre, les souris Nude immunodéficientes représentent le modèle permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris Nude seront hébergées dans un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes, ce qui permet qu'elles ne souffrent pas de leur défaut d'immunité. L'implantation d'une masse de cellules cancéreuses sera réalisée dans la peau de l'oreille de la souris. Ceci permet le suivi de l'évolution tumorale, la visualisation du réseau vasculaire,

ainsi que la diffusion et l'impact des molécules thérapeutique sur la masse tumorale et sa vascularisation. Afin d'optimiser les gestes et les conditions d'imagerie intravitale, une première expérimentation préliminaire sera conduite en amont. Puis le projet expérimental proprement dit sera organisé en deux grandes parties. Au total 155 souris seront utilisées. Partie préliminaire (15 souris, lot 1) : Implantation sous-cutanée de sphéroïdes. Partie 2 (80 souris, réparties sur les lots 2,3 et 4) : Évaluation de l'impact des molécules cytotoxiques et des agents de destruction vasculaire (Vascular Disruption Agents) sur la tumeur implantée. Partie 3 (60 souris, lot 5) : Mise en place de la thérapie assistée par ordinateur et validation. Ce projet est en conformité avec la règle des 3R. L'usage même d'un modèle informatique s'apparente à la notion de remplacement. La simulation des traitements et de leurs impacts sur le développement tumoral permet de limiter au maximum les expérimentations sur l'animal. Afin de réduire le nombre d'individus utilisés, les animaux du lot préliminaire qui développent des tumeurs seront incorporés dans le lot n°2. Le modèle informatique que nous utilisons a été développé sur la base d'observations réalisées en fenêtre dorsale. Nous avons choisi, afin de raffiner la procédure expérimentale, d'opter pour une implantation tumorale dans la peau de l'oreille. Cette solution se présente comme une alternative plus légère et moins traumatisante pour l'animal.

1433- *Campylobacter jejuni* est la première cause bactérienne de gastro-entérites humaines. Le poulet est le principal réservoir de cette bactérie, et *Campylobacter* est très fréquemment présent dans la flore intestinale des poulets, entraînant un risque de contamination des carcasses lors de l'abattage des animaux. Pour réduire la prévalence des contaminations humaines, il est impératif de réduire le portage de cette bactérie transmissible à l'homme, mais l'utilisation d'antibiotiques risque d'entraîner l'émergence ou la sélection de souches de *Campylobacter* ou d'autres bactéries résistantes aux antibiotiques. Pour cette raison, des solutions alternatives sont nécessaires. Les peptides antimicrobiens sont des substances d'origine naturelle qui peuvent tuer certaines bactéries. En modifiant la structure de certains peptides, il est possible d'augmenter la spécificité de leur spectre de manière à ce qu'ils aient une action très ciblée. Les essais qui seront réalisés dans cette étude visent à évaluer *in vivo* chez le poulet l'activité de peptides antimicrobiens qui présentent *in vitro* une importante activité inhibitrice vis-à-vis de *Campylobacter jejuni*. Les essais permettront de vérifier que cet effet inhibiteur vis-à-vis de *Campylobacter jejuni* est conservé *in vivo* et que les peptides antimicrobiens testés, du fait de leur spécificité vis-à-vis de *Campylobacter*, ne perturbent pas la flore digestive des poulets. Les expérimentations seront réalisées sur quatre lots de 15 poulets de dix jours d'âge élevés en isolateurs, soit 60 poulets pour l'ensemble du projet. Les quatre lots seront inoculés par voie orale avec une souche de *Campylobacter jejuni*, puis trois lots seront traités par voie orale avec, pour chacun, l'un des trois peptides à tester, et un lot sera non traité. Des prélèvements de matières fécales seront collectés régulièrement jusqu'à l'âge de 28 jours et le nombre de *Campylobacter jejuni* sera déterminé par culture. Le microbiote (ensemble des microorganismes vivant dans l'intestin) sera analysé par analyse métagénomique (analyse du contenu génétique des échantillons). Les résultats obtenus pour les trois lots seront comparés entre eux et au lot témoin non traité. Ils permettront de confirmer ou non l'efficacité *in vivo*, sur espèce cible, des peptides antimicrobiens testés et leur absence d'impact sur le microbiote des oiseaux. Ces résultats ne peuvent être obtenus que par expérimentation sur espèces cibles. Compte tenu de notre expérience, le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir des résultats significatifs en utilisant un minimum d'animaux par lot. Le protocole expérimental ne doit pas entraîner de souffrance animale, dans la mesure où 1) les inoculations et traitements sont faits par voie orale, 2) *Campylobacter* n'est pas pathogène chez le poulet et 3) les prélèvements sont collectés par massage cloacal deux ou trois fois par semaine maximum.

1434- Le projet a pour objectif d'évaluer l'efficacité de nouveaux composés pour le traitement des surcharges hépatiques en cuivre, caractéristiques de la maladie de Wilson (maladie génétique rare qui rend l'organisme incapable de se débarrasser de l'excès de cuivre). Il pourrait conduire au développement de médicaments capables d'aller chercher le surplus de cuivre dans les cellules du foie pour l'éliminer de l'organisme des patients. En effet, si le cuivre est un oligoélément essentiel à la vie, sa présence en excès est toxique pour l'organisme. Ce dernier règle très finement la quantité de cuivre dont il a besoin, entre l'absorption à partir des aliments et l'excrétion dans la bile à partir du foie. La toxicité du cuivre est telle que la maladie de Wilson est fatale quand elle n'est pas diagnostiquée à temps. Elle est actuellement traitée par des chélateurs systémiques peu spécifiques du cuivre, qui ont d'importants effets secondaires et ne sont pas toujours bien supportés. Des chercheurs ont imaginé aller chercher l'excès de cuivre directement dans les cellules du foie. Ils ont développé de nouveaux composés reconnus préférentiellement par ces cellules et capables d'y chélater le cuivre, sans perturber d'autres oligoéléments essentiels comme le zinc. Ces propriétés ont été confirmées *in vitro* sur des cellules de foie en culture. Pour la suite du projet, il faut désormais envisager le parcours de ces nouveaux composés dans un organisme entier, en tenant compte de toute sa complexité. Il est nécessaire de tester ces composés sur des modèles vivants, des mammifères qui présentent le même métabolisme du cuivre que l'homme. Le choix s'est porté sur un modèle rongeur génétiquement modifié qui développe la maladie de Wilson, modèle déjà bien caractérisé depuis 1999. Le projet prévoit le recours en 3 ans à 264 animaux provenant d'élevages autorisés. Ce nombre a été déterminé en réduisant au maximum le nombre d'animaux pour chaque expérience tout en assurant sa validité. Ce projet permettra de tester l'effet des nouveaux composés sur le foie de rongeurs malades. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une échelle clinique journalière du niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Les animaux modèles de la maladie de Wilson seront euthanasiés par exposition au dioxyde de carbone pour pouvoir observer par des coupes de leur foie l'état des cellules et mesurer le cuivre éliminé, selon le traitement adopté.

1435- 1-Le gène ITPR2 est un gène impliqué dans le vieillissement physiologique des cellules (on parle alors de sénescence). La sénescence est un mécanisme qui peut bloquer l'apparition de cellules pouvant devenir cancéreuses et amener leur élimination par les cellules environnantes. Toutefois la dérégulation de ce processus physiologique est une des étapes clé du développement tumoral. Nous voulons donc observer dans ce projet si la perte d'expression du gène ITPR2 va être impliquée dans l'apparition de cancer en utilisant les souris ITPR2 KO avec deux approches différentes. (1) Tout d'abord en regardant si l'absence de ce gène va se traduire par l'apparition spontanée de lésions cancéreuses au cours du vieillissement et (2) si la perte d'ITPR2 va modifier la survenue de lésions cutanées dans un modèle de carcinogénèse chimique en deux étapes (initiation DMBA et promotion TPA), notamment en augmentant la vitesse d'apparition, le nombre ainsi que la gravité des lésions cancéreuses. 2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie L'observation d'une base de données compilant des études sur l'expression de nombreux gènes dans du tissu cancéreux en comparaison avec du tissu normal en provenance de différents organes (base de données Oncomine) montre que le gène ITPR2 est bien sous exprimé dans la partie tumorale par rapport à la partie normale notamment dans le mélanome et le cancer du colon. Par notre projet, en utilisant un modèle murin existant, les souris ITPR2 KO, nous souhaitant montrer de façon claire le rôle de la perte d'expression du gène ITPR2 dans le processus de carcinogénèse, ainsi que les mécanismes mis en jeu. Cela ouvrirait alors la voie à de potentielles utilisations tant sur le plan thérapeutique que diagnostique.

3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Seul un modèle in vivo (modèle murin déjà existant) relevant peut démontrer que l'inactivation du gène ITPR2 favoriserait le processus de carcinogénèse spontanée ou induite. Cette hypothèse a été préalablement validée in vitro sur des cellules en culture.

Nous nous plaçons dans deux expériences où la sénescence est impliquée, à savoir le vieillissement et un modèle de carcinogénèse chimique dans lequel le rôle de la sénescence est clairement démontré. Le nombre d'animaux/groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet une classification des procédures expérimentales en classe de gravité modérée. 4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet. Au total 390 souris de différents génotypes (N=60 /groupe: wt, KO hétéro ou KO homozygotes pour le gène ITPR2, et par sexe) sont incluses dans ce projet. Les souris transgéniques élevées au sein de l'EU n'ont pas de phénotype nocif en absence de traitement chimique.

1436- L'hyperforine est une molécule bioactive extraite des fleurs de millepertuis ayant de nombreuses propriétés pharmacologiques très intéressantes. Par exemple, elle a des effets anti-tumoraux, anti-inflammatoires et antidépresseurs. Comme de nombreux antidépresseurs de synthèse, l'hyperforine inhibe la recapture de neurotransmetteurs. Chez l'animal, elle augmente les taux extracellulaires de catécholamines, de sérotonine et de glutamate et stimule la libération d'acétylcholine. Elle agit aussi au niveau des récepteurs de neurotransmetteurs en inhibant la capacité de liaison de ces molécules. Par ailleurs, les études in vitro et in vivo ont révélé que l'une des caractéristiques notables de l'hyperforine est sa capacité à altérer les processus cellulaires participant à l'équilibre de la concentration des cations tels que sodium (Na⁺), le calcium (Ca²⁺) et le Zinc (Zn²⁺). Elle régule l'expression de nombreux gènes dont ceux de TrkB, un important facteur de croissance. Selon certains auteurs l'hyperforine serait également capable de stimuler la neurogenèse hippocampique adulte. Ainsi, bien que de nombreuses cibles cellulaires aient été décrites, on ne connaît pas le ou les mécanisme(s) cellulaires et moléculaires sous-tendant l'action antidépressive de l'hyperforine. Nous avons déjà réalisé de nombreuses études in vitro sur des neurones en culture mais seule une étude sur l'animal permet de comprendre l'action sur le cerveau entier. Le modèle rongeur a été choisi car il s'agit d'un projet de recherche fondamentale. Dans ce projet, qui fait partie d'une étude plus globale en collaboration avec 2 autres laboratoires européens, des animaux transgéniques ont été développés, dépourvus d'une des cibles de l'hyperforine. Ils permettront de caractériser les effets neuronaux de l'hyperforine et de molécules dérivées qui pourraient s'avérer très utiles en neuropharmacologie. Ces effets seront évalués par des analyses de biologie moléculaire identifiant la nature des protéines présentes dans le cerveau des animaux. Les rongeurs sont nés et ont été élevés dans des établissements reconnus. Ils sont hébergés dans une animalerie agréée, dans un environnement enrichi, sous la surveillance journalière de personnels qualifiés et expérimentés. Leur nombre (40) reste réduit au minimum nécessaire permettant la réalisation de tests statistiques pour la validation des résultats. Les conditions expérimentales du traitement ont été définies en collaboration avec l'industrie pharmaceutique selon des critères rigoureux déjà en vigueur dans divers laboratoires européens travaillant dans ce domaine. Cette standardisation permet une très bonne comparaison des résultats et facilite les échanges entre les laboratoires. Tout au long de l'expérience, les animaux seront surveillés afin de veiller à leur bien-être et des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

1437- Les maladies infectieuses restent aujourd'hui un des principaux enjeux de santé publique. La vaccination a permis de lutter contre de nombreuses maladies, cependant nos connaissances actuelles dans ce domaine sont incomplètes. De meilleures connaissances devraient nous permettre de concevoir de nouveaux vaccins (en particulier contre les pathogènes et maladies qui « résistent » au développement des vaccins comme l'infection par le VIH et le SIDA, l'infection par Plasmodium et la malaria ou l'infection par Mycobacterium tuberculosis et la tuberculose), d'améliorer les vaccins existants, et d'accélérer le développement de nouveaux vaccins contre des maladies émergentes. Notre projet a pour but d'identifier les acteurs cellulaires et moléculaires sollicités dans les premières étapes de la réponse aux vaccins car nous pensons que ces étapes précoces influencent leur innocuité et leur efficacité. Le but ultime est de modéliser les étapes biologiques aboutissant à une protection contre les pathogènes, depuis l'injection du vaccin jusqu'à l'établissement de la mémoire du système immunitaire. Aujourd'hui, le virus de la vaccine atténué, le Modified Vaccinia virus Ankara (MVA), non pathogène en lui-même, est couramment utilisé comme vecteur pour des antigènes provenant d'agents pathogènes (VIH, Plasmodium, Mycobacterium...),

afin d'induire une protection contre leurs maladies associées. Pour mener à bien notre projet, l'animal est irremplaçable. La mise en place d'une immunité et son maintien sont complexes et mettent en jeu de nombreux partenaires cellulaires et moléculaires. Aucune méthode alternative in vitro ou in silico n'existe à ce jour. Le modèle de primates non humains vaccinés avec le MVA est pertinent. La proximité phylogénétique entre l'homme et l'animal, et en particulier les similarités de leurs systèmes immunitaires, font des primates des modèles expérimentaux de choix en immunologie/vaccinologie. Le nombre d'animaux inclus dans ce projet (38) a été réduit au minimum nécessaire pour permettre une analyse statistique robuste des données. Tous sont nés et ont été élevés en captivité dans des établissements agréés. Les réponses immunitaires seront suivies au niveau du site d'injection du vaccin (peau, tissu sous-cutané, muscle), du ganglion lymphatique drainant ce site et dans le sang. Il est nécessaire de connaître précisément l'interaction entre les différentes cellules et molécules mises en jeu lors de cette réaction immunitaire pour maîtriser les différentes stratégies de vaccination. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration du vaccin et prélèvement de sang et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le cas échéant le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider une euthanasie. Les animaux seront hébergés par paires ou en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1438- Chaque année en France, 60 000 bébés viennent au monde prématurément, soit 7,4 % des naissances vivantes. Et ce nombre est en perpétuelle augmentation (15% en 15 ans), ce qui place notre pays au 10e rang en Europe. L'importance de la question des atteintes cérébrales observées chez les enfants nés prématurément tient au grand nombre d'enfants touchés. Par exemple, environ 20% des prématurés, tous âges de prématurité confondus, auront une infirmité motrice cérébrale (quelle que soit sa gravité). Il est important de pouvoir diagnostiquer le plus tôt possible les hémorragies et les lésions de la substance blanche chez les prématurés alors que cela n'est pas possible avec l'échographie qui est actuellement l'examen de référence au pied de la couveuse. Notre projet a pour but de tester une autre technologie d'imagerie profonde du cerveau, dans un cadre de lésion cérébrale, et de l'amener vers les applications cliniques. Cette technologie est basée sur une approche tomographique d'optique diffuse résolue en temps, qui utilise la mesure par temps de vol des photons, ayant diffusés dans le milieu, pour construire une carte des propriétés optiques – absorption et diffusion – du cerveau néonatal. Nous testerons cette méthode sur un modèle de primate non humain de jeune cérébro-lésé et il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des élevages reconnus. Leur nombre (6) a été réduit au minimum nécessaire pour pouvoir caractériser les lésions induites. L'utilisation de primates non humains se justifie par la proximité des caractéristiques anatomiques, physiologiques et de développement du cerveau avec l'enfant nouveau-né. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

1439- L'infarctus du myocarde (IM) est aujourd'hui encore la première cause de mortalité dans la population adulte. Malgré une diminution très significative de la mortalité des patients souffrants d'IM grâce aux stratégies thérapeutiques développées dans les 40 dernières années, il existe une augmentation significative de l'incidence de l'insuffisance cardiaque (IC), une complication grave et fréquente de l'infarctus. Il est donc indispensable d'identifier et de traiter précocement les différentes conditions qui pourraient favoriser la progression de l'insuffisance cardiaque suite à un infarctus. Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAS), caractérisé par l'obstruction des voies aériennes supérieures lors du sommeil, est une pathologie très fréquente. Les patients atteints de SAS présentent des apnées répétées pendant le sommeil : on parle d'hypoxie intermittente (HI). De nombreux travaux expérimentaux ont montré que l'HI entraîne une plus grande souffrance du cœur suite à un infarctus et il a été clairement établi que l'HI est associée à une sensibilité accrue du cœur à l'augmentation de la taille de l'infarctus. En revanche, son rôle dans le développement de la dysfonction cardiaque post-infarctus n'est pas connu. Aujourd'hui, le seul traitement pour lutter contre les apnées consiste à porter un masque (PPC) comme support ventilatoire pendant le sommeil, mais les patients ont du mal à le tolérer et ce traitement n'empêche pas toutes les conséquences cardiovasculaires des apnées. C'est pourquoi il est aujourd'hui indispensable de l'associer avec des thérapeutiques complémentaires. Nous utilisons dans notre laboratoire un dispositif qui nous permet d'exposer des animaux à l'HI et de comprendre les mécanismes cellulaires expliquant pourquoi les animaux exposés à l'HI présente des altérations cardiovasculaires.

D'un point de vue mécanistique, des études ont mis en évidence un rôle majeur du stress du réticulum endoplasmique (RE) dans la physiopathologie de la maladie cardiaque ischémique. Nous souhaitons déterminer les effets de l'HI sur le remodelage ventriculaire et la dysfonction contractile dans un modèle de cardiopathie ischémique chez le rat. Nous évaluerons précisément l'impact du stress du RE HI-dépendant sur les perturbations de l'homéostasie calcique et les atteintes cardiaques. D'un point de vue thérapeutique, les bénéfices de l'entraînement régulier sur la santé cardio-vasculaire sont largement reconnus. Nous déterminerons donc dans ce projet si l'exercice prévient aussi le remodelage cardiaque et la dysfonction contractile HI-dépendants dans notre modèle de cardiopathie ischémique. Cette étude nous permettra d'évaluer l'importance de diagnostiquer et traiter précocement un SAS après un infarctus du cœur et de proposer une modalité d'exercice physique comme prise en charge thérapeutique optimisée, efficace et à faible coût, afin de ralentir le développement d'une IC. Cette étude nous permettra d'évaluer l'importance de diagnostiquer et traiter précocement un SAS après un infarctus du myocarde et de proposer l'exercice physique comme prise en charge thérapeutique optimisée, efficace et à faible coût, afin de ralentir le

développement d'une insuffisance cardiaque. Nous avons choisi de travailler avec des rats (200) exposés à l'hypoxie intermittente ou à la normoxie (contrôle) qui seront ensuite amenés à réaliser un entraînement régulier ou à séjourner simplement à l'animalerie. Les prélèvements seront réalisés toutes les semaines durant 4 semaines afin de comprendre la cinétique de développement de la maladie cardiaque, l'impact délétère de la pathologie respiratoire qu'est le SAS et les effets thérapeutiques d'un entraînement régulier. L'utilisation d'un modèle de rat est encouragée par nos travaux précédents dans lesquels nous avons reproduit les conséquences délétères du SAS mais aussi les effets bénéfiques de l'exercice. Nous utilisons également ce modèle animal car il a été couramment décrit pour l'application d'une IC post-infarctus. Le choix des techniques est varié et nous sommes dans l'obligation d'utiliser diverses techniques (in vivo et ex vivo) pour tester nos hypothèses très mécanistiques.

Enfin, concernant le bien-être des rats, ils seront hébergés en milieu enrichi selon les règles de bien-être des animaux dans une animalerie adaptée et autorisée et auront accès à l'eau et à la nourriture à volonté. Les animaux ne seront jamais manipulés dès leur arrivée dans l'animalerie mais les protocoles débiteront uniquement après une semaine de stabulation. Les animaux seront surveillés dans leur cage d'hébergement et les paramètres de bien-être seront contrôlés quotidiennement pour soulager le stress et l'inconfort.

1440- Toute opération chirurgicale est susceptible de provoquer des saignements plus ou moins importants. Généralement, un simple compression ou l'utilisation d'un bistouri électrique suffisent à arrêter ces saignements. Cependant, l'utilisation de moyens d'hémostase complémentaires peut être nécessaire: il s'agit de dispositifs médicaux, pouvant se présenter sous forme de compresse, éponge, gel... Leur application permet la coagulation du sang au niveau de la plaie et donc l'arrêt de l'hémorragie. Avant toute utilisation en milieu hospitalier d'un nouveau dispositif médical, il est indispensable de vérifier son efficacité chez l'animal, afin d'assurer la sécurité des patients opérés. Ce projet a pour objectif la validation d'efficacité de nouveaux dispositifs médicaux destinés à l'hémostase chirurgicale. Pour cela, au maximum 40 Porcs pourront être utilisés sur une durée de 5 ans, pour évaluer 10 produits innovants. Ce nombre d'animaux pourra être diminué en fonction des produits réellement évalués et des résultats obtenus. Le Porc est une espèce adaptée à ce type de test, du fait de la similarité de ses organes avec ceux de l'Homme. Durant tout le projet, les animaux seront hébergés en respectant les besoins de leur espèce, et manipulés par un personnel qualifié, afin de leur assurer un bien-être optimum.

1441- Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Les gliomes malins infiltrants du tronc cérébral (ou DIPG), qui représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont universellement incurables et constituent le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique à ce jour. Nous avons initié un programme de recherche pour caractériser ces tumeurs et montré qu'elles sont très différentes des gliomes de l'adulte et des tumeurs corticales de l'enfant. Des mutations originales de l'histone H3, quasi-constantes dans les DIPG et jamais décrites dans aucun autre type de cancer, ont été découvertes. Il s'agit donc d'un mécanisme oncogénique complètement inédit et intimement lié au développement de cette partie du cerveau. Par ailleurs, les DIPG ne forment jamais de masse tumorale, mais infiltrent les structures cérébrales normales puis se disséminent dans la totalité du cerveau. Ces propriétés d'invasion, caractéristiques des DIPG, et une cause fréquente de rechute après une radiothérapie initiale limitée au tronc cérébral, reposent sur d'importantes interactions entre la tumeur et son microenvironnement qui peuvent être étudiés exclusivement dans des modèles vivo. La compréhension des processus pathogéniques particuliers de ces tumeurs demeure un challenge afin d'identifier des cibles appropriées pour de futurs développements thérapeutiques. Compte tenu de la rareté du matériel tumoral, le développement de modèles de xénogreffes orthotopiques est décisif pour atteindre cet objectif. Pour cela, nous injecterons des lignées cellulaires dérivant de tumeurs de patients dans les régions du tronc cérébral ou de la ligne médiane de souris adultes immunodéficientes ou de jeunes adultes (Nude ou NSG). Afin d'obtenir un panel de modèles reflétant la variabilité inter-tumorale, 10 lignées cellulaires provenant de tumeurs différentes seront utilisées. Ne disposant pas d'information sur le taux de réussite de la prise de greffe et de manière à disposer, 10 animaux seront utilisés par lignée cellulaire. Les tumeurs obtenues seront le cas échéant transplantées consécutivement trois fois par greffe orthotopique de manière à tester leur stabilité et maintenir ces lignées, portant le nombre maximum d'animaux utilisés à 400. Dans un premier temps 3 lignées seront testées, si une prise tumorale supérieure à 50% est observée pour les 3 premières lignées injectées, nous pourrons réduire le nombre d'animaux greffés à 6 souris/groupe. Lors de ces premières expériences, les lignées seront injectées en parallèle dans des souris Nude ou NSG afin de choisir la souche optimale en termes de prise de greffe. L'ensemble des procédures expérimentales (greffe orthotopique et suivi du développement tumoral par bioluminescence) sont effectuées sous anesthésies. La chirurgie et le suivi par bioluminescence seront réalisés sous anesthésie générale pour limiter la douleur et le stress des animaux. Les animaux seront surveillés dans les heures suivant la greffe puis quotidiennement pour contrôler l'absence de dégradation de leur état général.

1442- Les anomalies de développement du cerveau sont à l'origine de malformations structurales entraînant épilepsie et retard mental chez les patients atteints. Si de nombreux types de malformations cérébrales ont été identifiés grâce à l'imagerie médicale, leurs causes et leurs conséquences sur le fonctionnement cérébral sont mal comprises. Dans ce projet de recherche, nous étudierons un modèle animal obtenu par transfert de gènes au sein du cerveau embryonnaire grâce à la transfection par électroporation in utero menée chez la rate gestante. Cette procédure permet de générer des animaux avec un cerveau mosaïque au sein duquel une population neuronale altérée se développe au contact des populations neuronales normales. Une telle altération génétique, focale, est particulièrement adaptée à l'étude des malformations cérébrales. Ainsi, le rat Dcx-KD

généralisé selon cette méthode, présente des caractéristiques génétiques, anatomiques et électro-cliniques similaires à celles des patients, et non reproduites par les approches génétiques conventionnelles chez la souris. Chez ce modèle pertinent, notre ambition est : 1/ de mieux comprendre l'organisation et le fonctionnement des réseaux neuronaux aberrants au sein et autour de la malformation cérébrale ; 2/ d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires contribuant à la mise en place de ces réseaux anormaux ; 3/ d'évaluer les conséquences fonctionnelles associées à la présence de ces réseaux aberrants, en terme d'épilepsie et de retard mental ; 4/ de développer des stratégies thérapeutiques innovantes visant à prévenir la mise en place ou le dysfonctionnement de ces réseaux aberrants. Ce projet combine des approches multiples menées chez un modèle animal unique au sein d'une même équipe de recherche (10 membres), permettant une utilisation au plus juste des effectifs d'animaux soumis à expérimentation (environ 2500 rats pour 5 ans). Une part importante des expérimentations est réalisée in vitro, sur tranches de tissu cérébral maintenue en survie artificielle lors d'enregistrements électrophysiologiques, sur tranches de tissu cérébral en culture, sur cultures neuronales primaires, ou spécimens histologiques. Les explorations fonctionnelles menées in vivo concernent l'enregistrement de l'activité cérébrale, explorations ne pouvant être effectuées que chez l'animal entier. Une partie des animaux explorés fait l'objet d'un monitoring vidéo associé à l'enregistrement de l'activité cérébrale, de l'activité motrice et de la température corporelle, permettant d'assurer une surveillance continue des indicateurs comportementaux. Les animaux sont hébergés en animalerie A2, font l'objet d'un suivi quotidien par les zootechniciens et les conditions d'hébergement sont enrichies (bâtons à ronger, tunnels). La souffrance et la douleur sont évaluées et traitées.

1443- La grippe est une infection virale aiguë qui se propage facilement d'une personne à une autre et qui peut toucher n'importe qui dans n'importe quel groupe d'âge. D'après l'OMS, la grippe est un problème de santé publique sérieux qui provoque des maladies graves et des décès dans les populations à plus haut risque. Au niveau mondial, elle est responsable de 250 000 à 500 000 décès par an. Le moyen le plus efficace de se prémunir de la maladie ou d'une issue grave est la vaccination. Des vaccins sûrs et efficaces existent et sont utilisés depuis plus de 60 ans. Cependant, les virus grippaux peuvent développer une résistance à ces médicaments. La recherche de vaccins ou molécules ayant une efficacité supérieure à celle des vaccins actuellement sur le marché reste donc indispensable. Ce projet a pour objectif de développer et de caractériser des modèles infectieux chez la souris après infection du virus de la Grippe (virus Influenza) dans le but d'évaluer l'efficacité de produits antiviraux. Lors de ce projet, l'imagerie médicale sera utilisée afin de suivre l'infection (virus rendus bioluminescents) et/ou la biodistribution de produits antiviraux (produits couplés à une molécule fluorescente). Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement l'anesthésie des animaux) et ne nécessitent pas de sacrifices d'animaux au cours du temps (suivi des mêmes animaux au cours du temps, diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire. Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre de groupe sera variable, pour chaque étude, en fonction du nombre de conditions expérimentales à tester. Un nombre maximal de 1000 souris (environ 40 animaux par étude), dans l'ensemble du projet, pourra être utilisé. Un nombre minimum de 6 animaux par groupe sera prévu afin de pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus. Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'efficacité et/ou la biodistribution de produits antiviraux dans un organisme entier vivant. L'espèce souris a été choisie car c'est un modèle standard polyvalent qui est régulièrement utilisé dans les études d'infectiologie. Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mises en place de traitement ou mise à mort des animaux) le plus rapidement possible. Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles molécules antivirales.

1444- Les patients souffrant d'une mutation dans un gène de réparation de l'ADN, nommé Cernunnos, sont microcéphales avec un retard de croissance notable ; certains présentent une polymicrogyrie (anomalie de l'organisation corticale des neurones). Le gène Cernunnos est situé dans une région du génome associée au développement de l'autisme (2q35). Un modèle rongeur déficient pour le gène Cernunnos a été développé pour mieux comprendre son rôle dans la réparation de l'ADN.

Nous proposons de réaliser une série de tests comportementaux afin de repérer un possible déficit mental (et/ou social) chez ces animaux. Nous étudierons d'abord leur activité nocturne pour mettre en évidence le moindre défaut moteur. Nous analyserons ensuite leur susceptibilité au stress en utilisant un dispositif en croix surélevée. Enfin leur sociabilité sera étudiée à l'aide du test de Crawley, dans lequel l'individu test peut circuler librement entre trois compartiments : l'un contenant un objet, l'autre un congénère et le dernier étant vide. Notre étude montrera si ces animaux mutés souffrent d'un déficit mental (et/ou social), et notamment d'une forme d'autisme. Si cela est avéré, ce modèle pourrait aider à comprendre le rôle du gène Cernunnos dans l'apparition des microcéphalies et/ou de l'autisme. Le modèle rongeur se justifie car il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des établissements reconnus. Leur nombre (180) a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences. Le suivi quotidien des rongeurs, hébergés en groupe, garantira leur bien-être. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Leur état de santé sera surveillé tout au long de l'expérience, afin d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

1445- Dans le cerveau, certaines altérations cellulaires sont une manifestation précoce des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington). Etant donné le nombre croissant de personnes âgées souffrant de ce type de maladies, et considérant le manque de biomarqueurs précoces en imagerie, la capacité d'évaluer et de quantifier ces altérations de manière non-invasive, serait d'un énorme intérêt. Ces biomarqueurs permettraient notamment de diagnostiquer plus tôt le déclenchement de la maladie ou de suivre de manière très fine son évolution. Cependant, aucun outil ne permet à l'heure actuelle de telles mesures. L'objectif global de ce projet est de développer de nouvelles méthodes de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) in vivo, afin de quantifier la morphologie cellulaire dans le cerveau de manière non-invasive. Après des développements méthodologiques in vitro, les méthodes RMN développées seront optimisées puis évaluées in vivo chez un modèle rongeur. Les animaux, nés et élevés en captivité, proviennent d'un élevage agréé. Leur nombre est réduit à 40, soit le minimum nécessaire pour développer les méthodes et atteindre une bonne précision de mesure. Les données de spectroscopie RMN seront modélisées, par le biais de nouvelles approches numériques développées dans ce projet, afin d'en extraire des valeurs quantitatives pour un certain nombre de paramètres structuraux et morphologiques des neurones et des astrocytes. A la fin de l'étude, les résultats obtenus en RMN in vivo seront comparés aux grandeurs mesurées par des méthodes ex vivo (microscopie optique et électronique), pour valider les nouvelles approches développées.

Le recours à l'animal est nécessaire car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules. Les modèles rongeurs sont pertinents pour l'étude du cerveau par RMN car leur petite taille permet de les examiner dans des scanners IRM à haute performance. Les examens de spectroscopie sont effectués sous anesthésie générale et avec application locale d'analgésique afin d'éviter tout stress ou douleur liés au système de positionnement de l'animal qui diminuerait le bien-être des animaux. Les animaux ne subiront pas de traitement spécifique dans le but d'induire une pathologie neuro-dégénérative. Les points limites attendus pour cette étude sont ceux classiquement attendus en élevage. Un suivi quotidien est assuré pour surveiller l'apparition de ces problèmes de santé. Des critères d'arrêt sont mis en place afin d'éviter toute dégradation importante de leur bien-être.

1446- La myopathie de Duchenne est une maladie due à une dégénération musculaire continue. Cette maladie engendre non seulement des problèmes de mobilité mais surtout des pathologies cardiaques et respiratoires menant à la mort prématurée des patients. Les cellules souches sont des cellules capables de s'auto renouveler mais également de se différencier en toutes les cellules composant le corps humain dont font partie les cellules musculaires. De nombreuses équipes essaient de reproduire in vitro, c'est-à-dire en dehors du corps humain et dans des conditions artificielles, certaines cellules spécifiques à partir des cellules souches. La thérapie cellulaire ou l'administration de cellules cultivées in vitro chez le patient pourrait permettre la cure ou une amélioration des conditions de vie de cet individu. Dans notre cas, nous avons créé un protocole permettant la production de « précurseurs musculaires » qui ont la capacité de se différencier en cellules musculaires (régénérer des muscles). Les résultats publiés chez le modèle murin montrent que la greffe de cellules souches différenciées en précurseurs musculaires peut dans une certaine mesure corriger au niveau tissulaire les défauts liés à une myopathie. Ce projet a pour but de tester le potentiel régénératif des cellules progénitrices que nous avons obtenues in vitro. En effet, nos résultats démontrent que nos cellules présentent les marqueurs de précurseurs musculaires cependant il nous est impossible de tester in vitro les capacités régénératives de ces cellules. La validation ultime de notre protocole est de confirmer que ces cellules ont la capacité de réparer un muscle préalablement endommagé en se différenciant en cellules musculaires. Nous nécessiterons environ 144 animaux pour la totalité du projet et respectons les règles 3R consistant en : i) Remplacement : Le test ultime in vivo dans un vrai muscle ne sera fait qu'à partir de lignées dont la différenciation myogénique a été validée in vitro. ii) Réduction : l'effectif d'animaux par groupe est optimisé pour obtenir des résultats statistiquement représentatifs. iii) Raffinement : Toutes les procédures sont faites sous une anesthésie générale et un traitement antalgique est prévu pour limiter la souffrance.

1447- La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un rhumatisme inflammatoire chronique entraînant une inflammation et une destruction ostéo-articulaire. Les cellules endothéliales (CE) sont au centre de la physiopathologie de cette maladie. Notre groupe a récemment développé un modèle cellulaire original, les CE dérivées des progéniteurs endothéliaux circulants (PECs), permettant d'étudier les perturbations de la biologie endothéliale. Des études préliminaires in vitro ont confirmé une capacité proliférative significativement plus élevée des CE dérivées des PECs issues de patients atteints de PR, comparés aux CE contrôles. Notre objectif est donc maintenant d'étudier les capacités des CE dérivées des PECs à stimuler les processus de néovascularisation in vivo. Afin de valider cet objectif, nous allons mettre en place un modèle murin de néovascularisation tumorale. Ce modèle murin est caractérisé par l'injection sous-cutanée de cellules syngéniques de carcinome colique murin, permettant le développement d'une tumeur sous cutanée sous 10 jours. Afin d'étudier le rôle des CE dérivées des PECs dans le processus néoangiogénique tumoral, les cellules de carcinome seront injectées en absence ou en présence de CE dérivées des PECs issues de patients atteints de PR ou de patients contrôles. La croissance tumorale sera évaluée par la mesure quotidienne du volume tumoral dans les différents groupes. Ce travail devrait permettre de mieux appréhender le rôle des CE de PR dans ce modèle de néoangiogénèse tumorale. Le but à long terme est de proposer de nouvelles perspectives thérapeutiques innovantes en ciblant l'inhibition de la néoangiogénèse synoviale de la PR en complément d'un traitement actif sur l'inflammation et les phénomènes dysimmunitaires. Un effort particulier sera réalisé pour diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en permettant des comparaisons statistiques cohérentes. Des études préliminaires sur cellules en culture ont été réalisées. Le nombre total de souris est de 40 au total. Un groupe de référence comportera 8 souris

ayant reçu les cellules tumorales seules. Les 32 souris restantes recevront les cellules tumorales et des CE humaines : soit 19 souris avec chacune les CE de l'un des patients PR sélectionnés et 13 souris avec chacune les CE de l'un des patients arthrosiques (contrôles). Afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligée aux animaux, des points-limites ont été établis, des antalgiques sont prévus en cas de nécessité ou la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

1448- La prévalence mondiale de l'obésité ne cesse d'augmenter. Aujourd'hui plus d'un milliard d'adultes sont en surcharge pondérale et au moins 300 millions de personnes sont obèses. L'obésité abdominale favorise le développement du syndrome métabolique et est souvent associée à une résistance à l'insuline. L'obésité est caractérisée par une hypoxie et une inflammation sous-jacente du tissu adipeux avec une augmentation de la production de molécules pro-inflammatoires. Cet environnement pro-inflammatoire altère la voie de signalisation de l'insuline dans les tissus périphériques, notamment les muscles. REDD1/DDIT4 est une protéine impliquée dans différentes voies de stress cellulaire comme l'inflammation et l'hypoxie. Nos résultats préliminaires *in vitro* ont montré que l'expression de REDD1/DDIT4 est corrélée avec l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires qui sont impliquées dans le développement de la résistance à l'insuline. L'utilisation de souris invalidées pour le gène codant pour la protéine REDD1/DDIT4 (lignée Ddit4tm1Fein que nous appellerons REDD1-/-) nous permettra de déterminer l'implication de cette protéine dans le développement de la résistance à l'insuline au niveau systémique.

Ce projet d'expérimentation animale fait suite à un premier projet dans lequel nous avons purifié la souche sur un fond C57Bl6/J et commencé à caractériser le phénotype des souris REDD1-/-. Nous avons mis en évidence des différences de sensibilité à l'insuline entre les lignées sauvages et les lignées REDD1/- soumises à un régime normal ou riche en graisse et souhaitons poursuivre nos travaux de recherche. Nous caractériserons le phénotype des souris REDD1/- dans des conditions standards ou soumise à un régime riche en graisse (prise alimentaire, poids, métabolisme de base par calorimétrie indirecte, observation du développement de la résistance à l'insuline). Pour chaque expérience un groupe contrôle de souris sauvage sur fond C57Bl6/J sera réalisé. Ce projet nécessitera une utilisation maximum de 558 souris. Pour satisfaire au remplacement, nous avons réalisé des études préliminaires sur cellules adipocytaires cultivées *in vitro* et nous avons pu montrer le rôle de Redd1 dans le développement de la résistance à l'insuline lors de l'hypoxie. Pour comprendre l'implication de cette protéine chez l'Homme, il nous est maintenant nécessaire de l'étudier sur l'animal car il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme. Pour satisfaire à la réduction, les animaux contrôles Redd1+/+ pourront être communs à différentes procédures et une gestion éthique de l'élevage nous permettra de ne pas générer trop d'animaux en excès. D'autre part, chaque procédure utilise un nombre d'animaux minimum mais nécessaire à des études statistiques pertinentes. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique, les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles d'éthiques. Enfin, bien qu'aucune souffrance particulière des animaux ne soit attendue, nos surveillances régulières nous permettront d'identifier les souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue ou euthanasie dans les cas les plus graves). L'objectif de ce projet est de comprendre le rôle de REDD1 dans le développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité. Ce projet pourrait mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

1449- L'objectif de cette procédure est d'évaluer le potentiel neuroprotecteur d'une illumination proche infrarouge chez des souris mutées pour le gène de l'alpha synucléine. Le potentiel neuroprotecteur d'une illumination cérébrale proche infrarouge a été démontré chez des souris parkinsoniennes traitées au MPTP et des rats 6OHDA. Ces modèles animaux sont assez éloignés de la maladie de Parkinson (MP) idiopathique humaine, chez qui le rôle de l'Alphasynucléine mutée est actuellement considéré comme déterminant. Dans cette optique, nous souhaitons évaluer l'effet neuroprotecteur d'une illumination proche infra rouge extra-cérébrale à 670nm (NIR) sur un modèle adéquat, fourni par la souche Engrailed de souris porteuses de la mutation de la protéine alphasynucléine (constitutive des corps de Lewy que l'on trouve dans la forme humaine), développant en 16 à 32 semaines un phénotype parkinsonien. Le protocole consiste donc à illuminer 150 souris Engrailed depuis leur naissance jusqu'à 32 semaines. L'illumination sera extra-cérébrale, quotidienne, limitée à quelques minutes. Le potentiel neuroprotecteur de l'illumination proche infrarouge sera évalué visuellement (observation quotidienne de l'état clinique des animaux) et par analyse d'image à l'aide d'un logiciel d'analyse du comportement. Un groupe d'animaux contrôles (non illuminés) sera utilisé de la même façon à titre de comparaison pendant la même période. L'évaluation finale se fera par analyse immuno-histologique. Les animaux seront hébergés en groupes respectant les portées d'origine, après sexage, dans des armoires isolées. L'illumination proche infrarouge est indolore et limitée à quelques minutes. Elle ne représente donc pas de contrainte pour les animaux qui seront habitués aux manipulations par les expérimentateurs pour limiter tout stress expérimental. Du fait du développement du phénotype parkinsonien dans le modèle murin choisi, si les points limites (signes de douleur ou d'inconfort importants, perte de poids >15% non contrôlable) sont atteints, les animaux seront euthanasiés précocement.

1450- Lors de la mise au point d'un produit test, l'évaluation de la dose maximale n'engendrant aucun effet secondaire indésirable permet de déterminer la dose d'administration qui sera préconisée lors de futures études d'efficacité. Ces études préliminaires permettent de pouvoir récolter des données sur les effets négatifs pouvant être examinés sur les organes cibles potentiels.

Lors de ce projet, l'imagerie médicale pourra être utilisée afin de détecter des molécules rendues fluorescentes (imagerie optique) ou radio-opaque (acquisitions CT et/ou μ -CT). La concentration de produit dans l'organisme entier, dans la

circulation sanguine et/ou dans certains organes cibles pourra ainsi être connue. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement l'anesthésie des animaux) et ne nécessitent pas de mises à mort d'animaux au cours du temps (suivi des mêmes animaux au cours du temps, diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire. Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. Pour chaque étude, en moyenne 10 groupes de 12 souris seront utilisés. Sur l'ensemble du projet, un maximum de 600 souris sera utilisé. Le nombre de groupe dépendra du nombre de produits tests pour lesquels la dose maximale n'engendrant aucun effet secondaire indésirable devra être évaluée. Dans tous les cas, un nombre minimum de 10 animaux par groupe sera prévu afin de pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus. Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable un organisme vivant. Ces études permettent de récolter des données sur les effets négatifs pouvant être examinés sur les organes cibles potentiels et ainsi déterminer la dose maximale des produits tests pouvant être administrée. Seule l'expérimentation animale permet de mettre en évidence les interactions possibles entre les molécules injectées et l'organisme. L'espèce souris a été choisie car c'est un modèle standard polyvalent qui est régulièrement utilisé dans les études de détermination de dose. Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi pouvoir décider de la mise à mort des animaux le plus rapidement possible.

1451- Les glioblastomes sont des tumeurs cérébrales de très mauvais pronostic, avec une survie médiane des patients à 15 mois après le diagnostic. La prise en charge de ces pathologies se fait de manière tardive car les symptômes se manifestent à des stades avancés du développement tumoral. Les traitements actuels consistent, lorsque c'est possible, en une exérèse chirurgicale suivie d'un traitement de chimio et/ou radiothérapie. D'une manière générale, cette prise en charge est palliative plus que curative et impose un constat d'échec pour ces thérapeutiques. Il est nécessaire de développer des stratégies innovantes de détection précoce des glioblastomes. Le présent projet propose d'adresser cette problématique à l'aide d'un modèle de rats génétiquement modifiés présentant des tumeurs cérébrales de manière spontanée en vieillissant. Aucun modèle alternatif ne permet d'étudier les réactions physiopathologiques corps entier associées à la présence d'une tumeur. Sur une durée de trois ans, ce protocole prévoit l'utilisation de 240 rats qui fourniront des données exploitables pour une puissance statistique suffisante afin de conclure à la fiabilité de l'identification d'un (ou plusieurs) biomarqueur(s) candidat(s) d'oncogenèse précoce. Ce nombre correspond au minimum d'individus nécessaires pour le maintien de la lignée, il n'y a donc pas de production surnuméraire pour ce projet. Le développement tumoral sera limité à une douleur modérée qui pourra être néanmoins traitée à l'aide de produits morphiniques. Ce modèle est un outil puissant pour étudier les stades précoces de développement d'une tumeur, l'oncogenèse. En associant plusieurs modalités de recherche autour de ce modèle, notamment la recherche de biomarqueurs sanguins et tissulaires et l'imagerie par résonance magnétique (IRM), nous pensons pouvoir identifier des signatures biologiques correspondant aux tous premiers stades de la pathologie. Cette approche permettra, à terme, de mieux connaître les processus qui conduisent à l'apparition des tumeurs. Ceci constitue un enjeu thérapeutique majeur ouvrant la voie à une prise en charge anticipée des patients, avec des traitements ciblés plus efficaces.

1452- Le glioblastome multiforme (GBM) ou glioblastome, également connu sous le nom d'astrocytoma de grade 4, est la tumeur primitive du cerveau la plus fréquente et la plus agressive. C'est une maladie rare qui touche trois personnes sur 100 000 en Europe et en Amérique du Nord (2400 cas par an en France) Le traitement, difficile et peu efficace, peut comprendre de la chimiothérapie, de la radiothérapie et de la chirurgie ou une combinaison des trois. Ces mesures sont considérées comme palliatives, c'est-à-dire qu'elles ne permettent pas la guérison et donc l'espérance de vie est très faible. Même avec une résection chirurgicale complète de la tumeur, combinée aux meilleurs traitements disponibles, le taux de survie au GBM reste très faible. Notre projet a pour objectifs de développer une nouvelle méthode de traitement pour les patients atteints du glioblastome. La microcuriethérapie est une approche thérapeutique qui consiste à placer une source radioactive de taille microscopique au sein ou à proximité d'une tumeur afin de détruire les cellules cancéreuses par irradiation. Le principal avantage de cette approche est de concentrer l'irradiation sur la tumeur, ce qui permet en principe de limiter la lésion de tissus sains, ainsi que les effets indésirables qui en résultent. L'objectif premier est donc d'évaluer la toxicité et l'efficacité de nos microparticules sur des modèles animaux de tumeurs induites ou spontanées de glioblastome en prévision des essais cliniques chez l'homme. Le porc est le modèle retenu, car il est très similaire à l'homme par rapport à l'anatomie de cerveau et il est préféré au rat du fait de sa grande taille permettant de mimer les conditions réelles de réalisation du traitement. Il n'est pas possible d'essayer un traitement aussi complexe uniquement sur des cultures cellulaires, le recours à l'animal est indispensable. Le nombre d'animaux utilisé sera environ 50 porcs pour toutes les phases du projet : mise au point du modèle, évaluation de la toxicité et essai du traitement. C'est le nombre minimum d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats interprétables scientifiquement. Cependant, si la preuve de l'efficacité de nos micro-particules peut être faite en utilisant moins d'animaux, nous en utiliserons moins. Les animaux auxquels des cellules tumorales auront été implantées feront l'objet d'un suivi attentif par des vétérinaires qualifiés, avec des moyens d'imagerie médicale de haut niveau. Les éventuelles souffrances induites par les tumeurs seront systématiquement traitées et combattues et aucune expérience ne sera poussée au delà des limites acceptables de souffrance. Les porcs seront maintenus dans des groupes sociaux, dans des parcs avec des jouets et de la litière pour fouiller.

1453- L'hypoxie cérébrale post-traumatique est un facteur indépendant de mortalité après un traumatisme crânien grave. Cette hypoxie tissulaire peut résulter de troubles ischémiques ou de la diffusion en oxygène, qui peuvent être responsables de

désordres métaboliques avec élévation de lactate endogène en conditions anaérobies. De même, une baisse de la consommation en oxygène est observée après un TC par dysfonction mitochondriale de la chaîne respiratoire. De par des effets bénéfiques sur la restauration de l'hémodynamique cérébrale ou sur la dysfonction mitochondriale, l'objectif de notre étude est donc d'étudier les effets de différents neuroprotecteurs sur le métabolisme cérébral évaluée à l'aide d'un monitoring multimodal dans un modèle expérimental de traumatisme crânien diffus par impact accélération chez l'animal. Design: L'étude comportera 4 groupes de rats Wistar males (350-500g) (n=10/groupes). Deux groupes de rats subiront un traumatisme crânien expérimental et recevront soit du placebo soit la molécule neuroprotectrice (TC-placebo et TC-neuroprotecteur). Deux groupes de rats non traumatisés recevront les mêmes traitements (sham-placebo et sham-neuroprotecteur). Les quatre groupes d'animaux seront au préalable placés sous anesthésie générale avant le début de la procédure afin de réduire la douleur et le stress engendré par l'équipement de monitoring et le traumatisme crânien pour les rats traumatisés. L'imagerie comportera des séquences IRM de diffusion, d'étude de la saturation tissulaire en oxygène et du débit sanguin cérébral. Le métabolisme cérébral sera mesuré par spectroscopie par résonance magnétique proton (1H) et phosphore (31P) au niveau du cortex et des noyaux gris centraux. Les animaux seront ensuite sacrifiés deux ou quatre heures après le traumatisme ou son horaire présumée pour les rats sham afin de réaliser une extraction mitochondriale et une analyse de la chaîne respiratoire par oxygraphie ou une étude en microscopie électronique pour analyse de l'œdème périvasculaire ou des mitochondries. Le nombre total de rats prévus en tenant compte de la mortalité de 50% au moment du TC est de 50 rats. Hypothèse principale: L'administration de molécule neuroprotectrice à la phase aigue d'un TC améliore le métabolisme cérébral et l'oxygénation tissulaire par diminution de l'œdème périvasculaire et donc de la perfusion tissulaire ou de la dysfonction mitochondriale post traumatique.

1454- L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est un outil puissant pour observer le cerveau. L'IRM joue donc un rôle central dans les hôpitaux comme dans les centres de recherche. Toutefois, l'IRM conserve un potentiel technique inexploré. L'objectif de ce projet est de développer de nouvelles méthodes d'imagerie pour caractériser de façon plus précise, plus complète et plus sûre le cerveau. Pour cela, nous développons de nouveaux outils pour acquérir des données IRM et évaluons de nouveaux agents de contraste. Le présent projet vise à étudier ces nouveaux outils sur le petit animal à des fins de mises au point, pendant 5 ans, sur le rat et la souris. Ces deux espèces animales seront étudiées en parallèle car elles nécessitent des optimisations spécifiques et toutes les deux doivent pouvoir être imagées par les chercheurs qui souhaitent ensuite utiliser ces nouveaux outils IRM. Le nombre d'animaux a été déterminé de manière à ce que les résultats puissent être statistiquement représentatifs : pour chaque expérience et permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Dans ce projet de 5 ans, nous prévoyons d'utiliser 1000 animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

1455- Les êtres vivants doivent faire face à d'importantes variations de leur environnement. La température est un paramètre majeur qui influence directement la vitesse des réactions chimiques et la physiologie de tous les organismes. Contrairement aux endothermes, les ectothermes possèdent des capacités limitées de production de chaleur et leur température corporelle est fortement dépendante des conditions environnementales. Leur biologie est donc directement influencée par la température ambiante qui va affecter tous les aspects de leur cycle de vie, depuis le développement embryonnaire jusqu'à la vie adulte. Les ectothermes ont souvent des affinités thermiques précises illustrées par les limites de distribution et les aires de répartition qui correspondent souvent à des climats spécifiques. Afin de mieux comprendre ces adaptations climatiques, il est nécessaire de connaître avec précision les gammes de tolérance physiologique qui varient considérablement d'une espèce à l'autre. L'hypothèse d'adaptation métabolique au froid prédit que les espèces à affinités froides ont un taux métabolique plus élevé et sont donc particulièrement vulnérables à l'augmentation des températures. Nous voulons tester cette hypothèse chez trois espèces de vipères avec des répartitions contrastées : la vipère péliade (*V berus*, espèce boréale), la vipère aspic (*V aspis* espèce de zone tempérée), la vipère ammodyte (*V ammodytes*, espèce méditerranéenne). Nous allons examiner la fonction des mitochondries qui sont des composantes cellulaires directement impliquées dans les adaptations thermiques. Ce projet reposera sur une petite biopsie musculaire (5 à 10mg) réalisée sous anesthésie générale et locale sur des animaux captifs. Ce prélèvement sera limité à 10 mâles et 10 femelles de chaque espèce et permettra d'étudier le fonctionnement mitochondrial à différentes températures. La cicatrisation est rapide du fait de la nature superficielle du prélèvement. La règle des 3R a été prise en compte de la façon suivante : Le Remplacement n'est pas possible car les expériences ciblent spécifiquement ces espèces. La Réduction a été prise en compte en limitant au minimum le nombre d'animaux employés. L'impact de l'expérience est très limité (biopsie) et les animaux retrouveront leurs conditions de captivités. Enfin, le raffinement comprendra l'utilisation d'anesthésie générale associée à une anesthésie locale lors du prélèvement.

1456- La varicelle est une maladie virale hautement contagieuse due à un herpès virus, le virus varicelle-zona (VZV). Ce virus peut provoquer la varicelle, habituellement au cours de l'enfance, mais également le zona, généralement plus tard dans la vie d'adulte. La varicelle est une maladie bénigne et spontanément résolutive chez l'enfant immunocompétent mais adopte souvent une forme plus sévère chez l'adulte. Chez l'adulte, la complication la plus courante est la pneumonie. Le VZV est présent partout dans le monde et, en l'absence de programme de vaccination, la plupart des individus sont infectés avant d'atteindre la moitié de leur vie. Le virus pénètre chez l'hôte par les voies respiratoires supérieures ou la conjonctive. Après l'infection primaire, le virus reste dormant dans les ganglions nerveux sensoriels et peut se réactiver ultérieurement en

provoquant un zona. Selon l'OMS, le taux de mortalité en 2010 était d'environ 3 décès pour 100000 cas dans les pays à revenus élevés. Environ 4,2 millions de cas de complications sévères entraînant une hospitalisation et 4200 décès seront relevés dans le monde pour l'année 2014. Dans les années 1990 des vaccins ont été élaborés et commercialisés. Différents calendriers de vaccination ont été étudiés pour obtenir la meilleure efficacité de prévention. L'objectif de ce projet est de caractériser la réponse immunitaire induite par le vaccin Varilrix, utilisé chez l'homme depuis 2004, et de la comparer à celle induite par d'autres candidats vaccins. Il comprend plusieurs étapes : la mise au point du modèle expérimental (vaccination et caractérisation de la réponse immunitaire mise en place) puis l'évaluation de l'efficacité de la réponse immunitaire induite par le vaccin contre une infection expérimentale par le VZV. Les essais de protection par des vaccins ne peuvent être réalisés que sur des organismes entiers vivants : aucun modèle cellulaire ou numérique ne peut reproduire la complexité d'une réponse immunitaire. Le modèle animal choisi pour ce projet est le primate non humain (PNH) afin d'avoir, d'une part, une réponse vaccinale similaire à la réponse humaine et, d'autre part, un modèle d'infection par le VZV comparable à la maladie humaine, uniquement d'un point de vue systémique car aucun signes cliniques ne sont détectables chez le macaque cynomolgus après infection par le VZV humain.

Au maximum 28 animaux nés et élevés dans des élevages agréés seront inclus dans le projet. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour interpréter les résultats.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (limitation des volumes prélevés, prélèvements sous anesthésie). Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination), le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires ou en modules individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

1457- Les mécanismes à l'origine de la formation des calculs à l'intérieur du rein sont encore mal connus. La saturation des urines et la prédisposition génétique sont des facteurs très importants concourant à l'initiation du calcul mais insuffisants pour expliquer la diversité des pathologies. Il existe plusieurs modèles de souris formant des calculs à l'intérieur des tubules mais il n'existe pas, à ce jour, de modèle murin permettant d'étudier la formation des calculs à la jonction cortico médullaire, à proximité du fornix, site préférentiel de dépôts calciques. Des travaux antérieurs ont montré la pertinence d'un nouveau modèle murin : des souris, supplémentées en calcium et en vitamine D pendant 15 jours, et injectée par du FGF7 (Fibroblaste Growth Factor) au septième et huitième jour montrent une prolifération des cellules urothéliales rénales à la jonction cortico médullaire ainsi qu'un dépôt calcique sur ces cellules dès 15 jours.

Notre projet est de développer ce nouveau modèle expérimental murin de lithogénèse accélérée :

- 1) Afin de démontrer le rôle potentiellement clé d'une prolifération de l'urothélium indépendamment d'un processus lésionnel dans la genèse des lithiases calciques intra rénal
- 2) Étudier les mécanismes impliqués dans la rétention des cristaux et leur clairance
- 3) Tester la réversibilité de ces dépôts, spontanément ou suite à l'administration de molécules solubilisatrices (citrate et catchines).

Selon la règle des 3R, le nombre d'animaux prévus est de 543 (effectif calculé au plus juste en fonction des tests statistiques). Les expériences prévues n'engendrent pas de douleur supérieure à celle reçue lors d'une piqure. Toutefois, l'état général des animaux sera surveillé quotidiennement, et le poids sera contrôlé trois fois par semaine. Les anesthésies seront adaptées et les points limites définis respectés.

Le projet a bénéficié d'une évaluation scientifique par la fondation pour la recherche médicale (FRM) qui a attribué une bourse « espoir de la recherche » pour ce projet.

Si l'implication de la prolifération de l'urothélium est confirmée, il serait alors nécessaire de prendre en compte en tant que facteurs de risques de calculs, non seulement la sursaturation des urines, mais également toute substance ayant un effet mitogène sur l'urothélium. L'identification de ces composés dans notre alimentation ou dans nos boissons constituerait alors un enjeu de santé publique.

1458- Une épidémie de maladie à virus Ebola a débuté en Guinée en décembre 2013 avant de s'étendre au Liberia, à la Sierra Leone et au Nigeria. L'épidémie actuelle, causée par la souche Zaïre du virus, est la plus meurtrière depuis la découverte des premiers cas en 1976. C'est la première fois que le virus est détecté hors d'Afrique centrale.

En mai 2015, l'OMS recensait 26 933 cas confirmés dont 11 120 décès en Guinée, Sierra Leone et au Libéria depuis le début de l'épidémie.

La transmission du virus Ebola nécessite un contact physique rapproché avec une personne infectée présentant des symptômes ou un contact avec des surfaces souillées par les liquides biologiques de la personne (vomissements, linge par exemple). Les personnels de santé sur le terrain et les femmes sont particulièrement touchés.

Devant l'urgence de la situation, des traitements expérimentaux sont en cours de développement et doivent être rapidement validés.

Les experts en éthique médicale de l'OMS, devant les circonstances de l'épidémie et sous réserve que certaines conditions soient remplies, ont abouti au consensus estimant qu'il est éthique d'offrir des traitements non homologués dont l'efficacité n'est pas encore connue ainsi que les effets secondaires, comme traitement potentiel ou à titre préventif.

Le T-705 a été développé pour traiter les infections aux virus Influenza . La molécule agit contre les virus à ARN. Dans les modèles animaux, le T-705 a principalement été utilisé par voie orale, mais le fabricant a développé un produit utilisable par voie intraveineuse.

Une première étude de pharmacocinétique du T-705 a été effectuée en début d'année sur 5 macaques Cynomolgus. Elle a permis de montrer que les doses de T-705 administrées 2 fois/jour n'étaient pas suffisantes pour obtenir un taux plasmatique suffisant toute au long de la journée (autorisation de projet APAFIS#131.01 du 24/02/15).

Dans ce nouveau projet, la pharmacocinétique de la molécule T-705 est analysée sur 8 macaques Cynomolgus (2 groupes de 4 animaux) dans le but de valider les doses pour son utilisation chez l'homme dans le traitement des infections à virus Ebola. Le nombre d'animaux testés a été réduit au strict minimum pour obtenir des données scientifiquement interprétables et les procédures expérimentales s'appuient sur les techniques les moins invasives disponibles en l'état des connaissances actuelles. Une attention particulière est portée aux animaux en terme d'enrichissement et de suivi comportemental.

1459- L'endoscopie bronchique fait partie des examens médicaux incontournables dans l'exploration des pathologies respiratoires de l'enfant.

Actuellement il n'existe pas de simulateurs électroniques adaptés pour l'apprentissage de la technique.

Dans un premier temps, il est prévu des essais sur des mannequins en plastique pour apprendre la manipulation des outils d'endoscopie et à se familiariser avec l'exploration des voies aériennes. Mais la réalisation d'une endoscopie en toute sécurité pour l'enfant et qui puisse permettre d'obtenir des renseignements optimaux nécessite un apprentissage sur l'animal vivant. Chaque cours dure 3 jours et comprend 4 parties : Une partie de cours théoriques sur l'endoscopie (25% du temps)

- comment mettre en place une unité d'endoscopie
- voies aériennes supérieures et inférieures normales et pathologiques
- lavage broncho alvéolaire
- biopsie, biopsie transbronchique
- sédation et tolérance

Une partie de sessions vidéo de cas d'endoscopie pédiatriques (25% du temps)

Une partie pratique sur mannequins (simulation) (10% du temps) :

Elle permet de se familiariser avec l'exploration de la distribution anatomique des voies aériennes de l'homme. Par contre le mannequin ne permet pas de réaliser des gestes spécifiques en-dehors de cette exploration.

Une partie pratique sur porcs anesthésiés (40% du temps) : 3 ateliers – 3 animaux/atelier

a) 1er atelier :

- endoscopie simple,
- re-intubation aidée de l'endoscope,

b) 2ème atelier

- réalisation de lavage bronchoalvéolaire,
- réalisation de biopsie bronchique,

c) 3ème atelier

- réalisation de biopsie transbronchique,
- extraction de corps étrangers (plastique et végétaux) à l'aide de pince et de panier.

Il est prévu 15 apprenants / cours ; 2 cours par an. Les apprenants sont des médecins pédiatres travaillant dans un service de pneumologie pédiatrique ou en soins intensifs et souhaitant développer leur expérience et leurs connaissances en endoscopie bronchique et dans les différents gestes.

Il est prévu 1 formateur par animal pour assurer l'encadrement des travaux pratiques.

Nous avons prévu 5 apprenants/animal/atelier afin de permettre à chacun de pratiquer et d'obtenir une bonne maîtrise de la gestuelle tout en limitant le nombre d'animaux.

Au total, le nombre d'animaux estimé est de 9 porcelets par cours, soit 18 porcelets/an. Au total nous prévoyons 90 porcelets/ 5 ans.

Toutes les interventions seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie adaptées. En fin de procédure, tous les animaux seront euthanasiés par surdosage de barbituriques, les animaux étant sous anesthésie générale.

1460- L'acide rétinoïque tout-trans (ATRA) est essentiel aux vertébrés. Notre recherche consiste à comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires que l'ATRA contrôle in vivo pour exercer ses effets multiples sur la prolifération et la différenciation des cellules. L'épithélium séminifère du testicule, siège de la spermatogenèse, représente notre modèle d'étude pour analyser les effets de l'ATRA car (i) son fonctionnement est altéré en cas de carence fonctionnelle en ATRA, et (ii) il intègre de nombreuses problématiques différentes (identité, destin, prolifération, morphogenèse cellulaire, présence de cellules souches, environnement de niche, divisions mitotique et méiotique, mort cellulaire programmée, signalisation paracrine).

L'état actuel de connaissances montre que la spermatogenèse est un processus extrêmement complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires à la fois. Notre étude vise à comprendre les effets paracrines (entre les différents types cellulaires du testicule) et endocrines (par l'intermédiaires de substances sécrétées dans l'organisme) de l'ATRA in vivo dans un système physiologique à part entière. Seule une approche expérimentale avec des animaux in vivo permet de répondre à ces questions. Le remplacement (1er R de la règle des 3R) par un système in vitro n'est pas possible.

Pour appréhender ces questions, la souris constitue le modèle de choix du fait de la possibilité de modifier son génome à volonté, de la ressemblance de son génome à celui de l'homme, et de la sensibilité de sa spermatogenèse à l'ATRA identique à celle de l'homme. Nous combinons des approches génétiques, pharmacologiques et moléculaires pour comprendre comment l'ATRA exerce ses effets. Pour cela nous créons des souris porteuses d'une ou plusieurs mutations nulles ou ponctuelles dans les gènes codant pour les protéines qui relayent le signal convoyé par l'ATRA, ou certains de ses gènes cibles. Les protocoles mis en œuvre permettent d'analyser le phénotype des souris mutantes. Le présent protocole vise à permettre de tester (i) l'intégrité fonctionnelle de barrière hémato-testiculaire chez les souris mutantes ; (ii) la capacité de gènes cibles de l'ATRA à restaurer la spermatogenèse chez des souris mutantes pour lesquelles la voie de signalisation de l'AR est abolie.

Le nombre d'animaux requis est de 1554 souris au maximum. Seuls des mâles sont utilisés. Ces nombres sont calculés au plus juste pour satisfaire aux exigences en matière de réduction du nombre d'animaux utilisés tout en assurant la qualité des résultats obtenus et la robustesse de leur validité statistique. La réduction du nombre d'animaux (2e R de la règle des 3R) est donc appliquée dans notre projet.

Le phénotype des animaux n'est pas délétère à leur bien-être car il se limite à la stérilité des mâles (chez les mutants avec une voie de signalisation de l'ATRA abolie ou en cas d'altération de la barrière hémato-testiculaire). Nous tentons de corriger cette stérilité. Les actes chirurgicaux nécessaires et les injections intraveineuses sont réalisés sous anesthésie générale afin d'éviter toute douleur ou stress. Une analgésie est également assurée au réveil des animaux et, si nécessaire, pendant la période post-opératoire. Nous respectons ainsi le raffinement (3e R de la règle des 3R) dans ce projet.

1461- Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, le stress est impliqué dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France.

Au plan des traitements, l'arsenal pharmacologique disponible concernant l'anxiété et le stress présente de nombreuses limitations de part les effets secondaires importants et/ou l'efficacité limitée de ces molécules. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux produits plus efficaces représente donc un enjeu sociétal et économique majeur. La prévention de l'anxiété et du stress par exemple à l'aide de techniques de relaxation ou par des facteurs nutritionnels semble également une approche alternative prometteuse.

Le test du labyrinthe en croix surélevé (LCS) est l'un des modèles d'anxiété les plus utilisés chez le rongeur. C'est donc un outil de choix pour l'évaluation de nouveaux traitements.

Ce test est basé sur l'aversion innée des rongeurs pour les espaces ouverts. Dans cette situation, le rat est placé dans la partie centrale d'un labyrinthe en forme de croix surélevé par rapport au sol. Il est composé de 2 branches ouvertes opposées et de 2 branches fermées opposées. Un animal normal évite les branches ouvertes tandis qu'un animal traité avec un agent anxiolytique explore de manière accrue cet espace.

Le comportement des animaux dans ce test est sensible aux conditions d'applications du test. Les facteurs connus pour faire varier le comportement des animaux sont, de manière non exhaustive, la souche de rat, le stress engendré par les manipulations, la luminosité...L'origine des rats (éleveur) et les conditions d'élevage et de stabulation peuvent également avoir un effet sur le comportement des rats. La maîtrise de ses facteurs est déterminante pour la qualité des études réalisées. Les effets de nouveaux traitements potentiels peuvent ne pas être détectés si les animaux sont dans un état d'anxiété trop faible ou trop élevé, ou si leur comportement est trop variable.

Les fournisseurs et les laboratoires modifiant régulièrement les conditions d'élevage des rats pour des raisons de réglementation, d'amélioration de la qualité ou par souci éthique, une dérive progressive dans le comportement des rats dans le test du LCS a été observée. L'objectif du présent projet est de comparer le comportement de type anxieux des rats provenant de 2 éleveurs pour déterminer les conditions optimales d'application du test prenant en comptes les méthodes actuelles d'élevage. La sensibilité des animaux à différents traitements sera évaluée.

Dans ce projet, 72 rats seront utilisés, en 2 lots de 36 animaux provenant chacun d'un éleveur différent. Chaque lot sera réparti en 3 groupes de 12 rats recevant un traitement différent (eau de source, diazépam et produit X). Les animaux sont placés dans le LCS pendant 5 minutes et leur comportement est enregistré. Aucune douleur n'est induite par ce test. Les animaux seront mis à mort à l'issue de ce test.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais permettront de déterminer la variabilité dans le modèle en fonction de l'éleveur et du traitement utilisé, ce qui permettra à l'avenir de réaliser des calculs de puissance statistique pour déterminer le nombre optimal d'animaux à utiliser pour chaque étude. Cela évitera d'utiliser trop (réduction) ou trop peu (raffinement) d'animaux et de permettre ainsi l'exploitation des résultats. Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins d'expérimentation animale, les animaux de ce projet auront déjà participé à un projet précédant avec une sévérité de classe modérée et après avis favorable du vétérinaire référent.

1462- La chlorelle et la spiruline sont deux microalgues très largement étudiées en santé humaine pour leur richesse en composés ayant un effet bénéfique sur la santé des organismes (effets antioxydants, antimicrobiens, antiviraux) et pouvant par conséquent constituer une alternative à l'utilisation des antibiotiques en élevage. En production porcine, le sevrage est une étape critique durant laquelle les changements alimentaires, sociaux et environnementaux entraînent l'apparition de troubles digestifs et une diminution des performances de croissance durant les semaines qui suivent le sevrage. Ce protocole,

impliqué dans un programme de thèse, vise à déterminer l'effet de la supplémentation en chlorelle et en spiruline sur les performances de croissance et la santé digestive du porcelet sevré. Il fait suite à un premier protocole exploratoire réalisé en 2014, n'ayant montré que peu d'effets de cette supplémentation sur ces paramètres, impliquant un questionnement sur la biodisponibilité des molécules potentiellement actives, contenues dans les microalgues. Deux critères majeurs affectent la biodisponibilité des composés des microalgues : la haute résistance de la paroi cellulaire à la dégradation et le traitement thermique de séchage de la biomasse après culture. L'étude vise donc à tester l'effet de la supplémentation en chlorelle et spiruline, ainsi que l'effet d'un traitement optimisant la biodisponibilité de leur contenu (rupture de la paroi cellulaire et séchage à basse température) :

- Sur les performances zootechniques (croissance, ingestion, mortalité, morbidité)
- Sur la santé digestive et la santé générale (statut inflammatoire, intégrité du tube digestif, diversité du microbiote et colonisation par des pathogènes)
- Sur l'assimilation des nutriments (digestibilité)

Les effets seront étudiés par comparaison à un groupe recevant un aliment standard premier âge pour porcelet sevré, sans antibiotique. Le protocole se base sur un modèle de dégradation de l'hygiène du logement (pas de nettoyage avant et pendant l'expérience ni de vide sanitaire après la bande précédente) et d'une réduction de la température ambiante 5 jours après le sevrage, afin de favoriser l'apparition de troubles digestifs.

Le protocole comprendra cinq lots de 16 porcelets sevrés à 28 jours, logés en cages individuelles, recevant chacun un régime expérimental pendant deux semaines (un aliment sans supplémentation, ou supplémenté à 1% en chlorelle ou 1% en spiruline, séchées par atomisation ou broyées puis séchées à froid par lyophilisation).

Ce protocole prévoit le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Réduction : le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour la comparaison des performances de croissance et des mesures de santé digestive. Le protocole prévoit la réutilisation des animaux au-delà de sa durée, dans le circuit commercial ou dans le cadre d'autres expériences. Raffinement : les procédures de mesures, prélèvements et abattage ont été construites de manière à réduire au minimum le stress et la douleur occasionnés à l'animal. Remplacement : l'étude ne permet pas de remplacer le modèle animal par des méthodes alternatives.

1463- Certains composés administrés à l'animal, sont peu stables, c'est-à-dire qu'ils sont éliminés rapidement (en quelques heures voire même minutes) de la circulation générale, ce qui limite leur efficacité in vivo alors qu'in vitro ils présentent une forte activité. C'est notamment le cas pour les protéines et peptides.

Une alternative est de traiter les animaux plusieurs fois par jour, ce qui est contraignant et surtout stressant pour l'animal. Une autre possibilité pour optimiser l'efficacité thérapeutique de ces composés est d'utiliser des pompes à perfusion miniatures implantables chez l'animal. Ces minipompes permettent l'administration en continu d'une substance qui est libérée de manière régulière et constante pendant une durée de quelques jours à plusieurs semaines, évitant ainsi la manipulation répétée des animaux et permettant une optimisation du traitement. L'administration continue d'un traitement est fréquente chez le patient dans le cadre de traitement anti-cancéreux.

Ce projet a pour objectif d'implanter des minipompes en sous-cutanée à des rongeurs (souris ou rats) pour prolonger l'exposition de composés dont la durée de vie dans la circulation sanguine est trop courte pour permettre une évaluation après une ou des administrations ponctuelles. Des prélèvements sanguins seront réalisés régulièrement chez l'animal anesthésié pour doser la concentration plasmatique de ces composés. Les volumes de sang sont prélevés en accord avec le poids de l'animal et les temps de récupération nécessaires. Un nombre de trois animaux par dose, et par produit sera utilisé.

L'implantation consiste en une incision et au décollement de la peau pour permettre le placement d'une minipompe adaptée à cet usage. Cette intervention se fait sous anesthésie générale gazeuse d'une dizaine de minutes, un analgésique est administré avant et après l'intervention pour limiter la douleur. Ce projet concerne un total de 5000 animaux sur une durée de 5 ans.

1464- Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, le stress est impliqué dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France.

Au plan des traitements, l'arsenal pharmacologique disponible concernant l'anxiété et le stress présente de nombreuses limitations de part les effets secondaires importants et/ou l'efficacité limitée des ces molécules. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux produits plus efficaces représente donc un enjeu sociétal et économique majeur. La prévention de l'anxiété et du stress par exemple à l'aide de techniques de relaxation ou par des facteurs nutritionnels semble également une approche alternative prometteuse.

Le test de l'enfouissement défensif conditionné (EDC) est l'un des tests permettant d'évaluer l'anxiété chez le rongeur. Ce test est notamment connu pour sa sensibilité à la plupart des anxiolytiques (agents pharmacologiques qui réduisent l'anxiété) efficaces chez l'homme. C'est donc un outil de choix pour l'évaluation de nouveaux traitements.

Dans cette situation, le rat est placé dans un environnement connu dans lequel un élément nouveau a été ajouté : une électrode qui délivre un seul et unique choc lors du premier contact de l'animal avec l'une de ses pattes. En réaction, le rat projette la sciure disposée sur le sol vers l'électrode. Ce comportement d'enfouissement est directement corrélé au niveau d'anxiété des rats. Ainsi, les produits qui présentent des propriétés de type anxiolytiques réduisent la durée d'enfouissement.

Le comportement des animaux dans ce test est sensible aux conditions d'applications du test. Les facteurs connus pour faire varier le comportement des animaux sont, de manière non exhaustive, la souche de rat, l'intensité du choc, le type de sciure, le protocole d'habituation,...L'origine des rats (éleveur) et les conditions d'élevage et de stabulation peuvent également avoir un effet sur le comportement des rats, notamment l'enrichissement utilisé ou non. La maîtrise de ses facteurs est déterminante pour la qualité des études réalisées. Les effets de nouveaux traitements potentiellement peuvent ne pas être détectés si les animaux sont dans un état d'anxiété trop faible ou trop élevé, ou si leur comportement est trop variable.

Les fournisseurs et les laboratoires modifiant régulièrement les conditions d'élevage des rats pour des raisons de réglementation, d'amélioration de la qualité ou par souci éthique, ainsi que les animaux reproducteurs, une dérive progressive dans le comportement des rats dans le test de l'EDC a été observée. L'objectif du présent projet est de comparer le comportement d'enfouissement des rats provenant de 2 éleveurs, en fonction de l'intensité du choc, pour déterminer les conditions optimales d'utilisation du test prenant en comptes les méthodes actuelles d'élevage.

Dans ce projet, 72 rats seront utilisés, en 2 lots de 36 animaux provenant chacun d'un éleveur différent. Chaque lot sera réparti en 3 groupes de 12 rats recevant un choc électriques à 3 intensités croissantes.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais permettront de déterminer la variabilité dans le modèle en fonction de l'éleveur et de l'intensité du choc, ce qui permettra à l'avenir de réaliser des calculs de puissance statistique pour déterminer le nombre optimal d'animaux à utiliser pour chaque étude. Cela évitera d'utiliser trop (réduction) ou trop peu (raffinement) d'animaux et de permettre ainsi l'exploitation des résultats.

1465- Tout expérimentateur est amené à acquérir, entretenir ou perfectionner une technique impliquant les modèles animaux. Ce projet est dédié à l'entraînement du personnel sur les gestes nécessaires à la bonne réalisation des procédures expérimentales de projets nécessitant l'utilisation de hamsters. Ces gestes sont acquis à l'occasion de formations, animées par des formateurs soit internes à l'entreprise (transmission des compétences, tutorat) ou externes (harmonisation des méthodes d'administration et de prélèvement...). Ce projet s'inscrit dans l'obligation réglementaire décrite dans l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques.

Il permet, par la mise à disposition d'ateliers au sein de l'établissement, de s'assurer et de valider la compétence du personnel dans le cadre de la formation continue.

Un entraînement régulier et une bonne compétence du personnel, contribuent à une réalisation efficace des études, augmentant la fiabilité des résultats, et respectant le bien-être animal par la pratique de gestes maîtrisés.

Le type de geste est choisi et adapté en fonction des besoins d'apprentissage et/ou de perfectionnement pour les études prévues sur le modèle hamster. Les techniques d'administrations de produits en intra-péritonéale (IP), per os (PO), sous-cutanée (SC), intramusculaire (IM) pourront être réalisées chez l'animal vigile.

La plupart des gestes de prélèvements sanguins ainsi que les gestes pouvant générer un stress, du fait du caractère d'entraînement de ce projet seront réalisés sous anesthésie.

En fonction du type de gestes abordé en atelier, les hamsters pourront éventuellement être utilisés sur plusieurs sessions.

On peut estimer à environ 25, le nombre d'animaux utilisés chaque année dans le cadre de la formation du personnel.

1466- Actuellement, chez l'Homme, la chirurgie hépatique constitue le seul traitement curatif des tumeurs malignes du foie. Elle consiste en l'ablation d'une partie plus ou moins importante du foie, mais il faut laisser suffisamment de tissu pour que le foie puisse continuer d'exercer sa fonction après l'intervention. Lorsque le volume du futur foie restant risque d'être insuffisant, on aura recours à une technique permettant d'augmenter ce volume (et donc une valeur fonctionnelle suffisante). Cette technique appelée embolisation portale consiste à occlure, un mois avant l'intervention, les branches de la vascularisation portale de la partie du foie qui sera retirée. Une augmentation de l'ordre de 40% du volume et de la fonction du foie restant est alors observée.

Des biomatériaux d'embolisation non résorbables sont généralement injectés sous contrôle radiographique. Cependant, une technique d'embolisation réversible, à l'aide d'un produit résorbable, constitue une alternative moins invasive, en particulier en cas de fuite du produit d'embolisation dans une branche controlatérale. Notre équipe a mis au point une technique efficace d'embolisation portale partielle résorbable (EPPR) chez le singe et l'utilise actuellement chez l'homme. De plus nous avons montré que chez le rat, l'EPPR permettait, en pouvant répéter les embolisation, d'induire une régénération plus importante que celle obtenue après une embolie unique.

L'objectif de ce projet est de démontrer la faisabilité technique, la qualité et la réversibilité de la procédure d'EPPR chez le porc en tant que modèle pré-clinique. De plus, nous pourrions étudier dans ce modèle l'impact de la répétition des procédures d'EPPR, ce qui n'est techniquement pas réalisable chez le rat. Nous évaluerons l'efficacité de l'EPPR en termes de régénération hépatocytaire et de volumétrie hépatique.

4 animaux sont prévus pour la mise au point technique et trois groupes de huit porcs seront constitués pour l'étude elle-même soit 28 individus au total : un groupe recevant plusieurs procédures d'EPPR, un groupe témoin recevant une embolisation portale définitive à l'aide d'un matériel non résorbable, un groupe témoin recevant une ligature portale chirurgicale associée à une hépatotomie. L'occlusion du flux portal intéressera approximativement 75% du volume du foie total. Les conséquences de l'EPPR seront étudiées en fonction du temps par des évaluations scannographiques de la volumétrie hépatique et des analyses histologiques de la régénération hépatocytaire.

Ce travail pré-clinique devrait permettre de poser les bases d'une stratégie alternative efficace aux méthodes actuelles de régénération hépatiques avant hépatectomie majeure. Le passage sur un modèle anatomiquement proche de l'homme est irremplaçable afin de juger de l'effet de la manipulation réalisée en conditions proches de celles de la clinique. Le nombre de 8 animaux par groupe est le plus réduit possible pour obtenir des résultats exploitables tenant compte de la grande variabilité liée aux techniques micro-invasives elles-mêmes. Les 4 animaux destinés à la mise au point technique seront inclus dans l'étude si cette mise au point est plus rapide et le nombre total d'animaux diminué d'autant. Les animaux bénéficieront de traitements analgésiques et d'anesthésies similaires à ceux mis en place chez l'homme et seront surveillés quotidiennement.

1467- L'obésité est devenue une des principales causes de morbidité dans les pays industrialisés et est devenue un enjeu grandissant de santé publique. Des facteurs génétiques et environnementaux jouent un rôle dans le développement de l'obésité. Le régime alimentaire est l'un des principaux facteurs qui contribue à cette maladie. Des études chez l'homme ont montré qu'une augmentation d'une prise de poids est associée à un gain de graisse corporel qui peut mener à l'obésité et d'autres maladies métaboliques associées (résistance à l'insuline, dyslipidémie et diabète de type 2).

L'enjeu est d'identifier la génétique et les mécanismes physiologiques de l'obésité et des maladies associées, afin d'en déduire les stratégies thérapeutiques les plus efficaces pour freiner, voire stopper la progression de ces pathologies.

Les modèles animaux rongeurs sont un outil de référence pour l'étude des mécanismes impliqués dans l'obésité par leur facile prise de poids lorsqu'ils sont nourris avec un régime riche en matières grasses. Ils fournissent une base expérimentale à des stratégies thérapeutiques. Dans cette étude, sur 5 ans, 25500 animaux de 3 espèces différentes (rats, souris et hamsters) seront utilisés.

La règle des 3R s'applique ici pour les principes de réduction et de raffinement.

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement (bâtons de bois et bandes de papier kraft pour tous et abris en plus pour les souris. De plus, une surveillance et une observation des animaux sont réalisées quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur.

Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et, approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal.

1468- Les maladies parodontales sont des pathologies inflammatoires d'origine infectieuse conduisant à la destruction irréversible du parodonte. Ces pathologies sont très fréquentes et peuvent affecter tous les individus, quel que soit leur âge. En France, selon l'enquête ICSII réalisée par l'ADF sous l'égide de l'OMS, plus de 80 % des adultes entre 35 et 44 ans souffrent de maladies parodontales. Beaucoup estiment à tort cette situation inéluctable et se résignent à porter vers 60 ans un dentier.

Des études récentes mettent en évidence les rapports entre maladie parodontale et état général. Ainsi, les femmes enceintes qui présentent une parodontite sévère ont un risque accru (3 à 7 fois) d'accoucher prématurément d'un enfant à faible poids. De même, les patients atteints de parodontite ont un risque d'atteinte cardiovasculaire accru de 25 %. Les parodontites représentent un véritable enjeu de santé publique. A ce jour, nous manquons de connaissance pour comprendre 1- pourquoi certains individus développent des parodontites, 2- comment la parodontite peut influencer sur des mécanismes pathologiques à distance, 3- comment moduler l'inflammation pour traiter la parodontite, 4- quels biomarqueurs nous permettraient de suivre cette pathologie.

Notre objectif est d'étudier les mécanismes de la destruction parodontale en réponse à une infection bactérienne dans un modèle de parodontite expérimentale chez le rongeur.

Pour cela, nous allons induire une parodontite expérimentale en insérant un fil imprégné de bactéries entre la dent et la gencive chez l'animal anesthésié. Le fil irrite la paroi interne de la gencive et favorise la pénétration des bactéries buccales et l'inflammation chronique du parodonte. Nous comparons la réponse inflammatoire et de destruction du parodonte conduite par le fil et celle induite par le fil imprégné de bactéries pour étudier le rôle plus spécifique de l'infection dans la destruction du parodonte. Un suivi longitudinal de la perte osseuse induite sera réalisée par imagerie. Les animaux seront anesthésiés à pour éviter toute souffrance. Des expérimentations similaires ont montré que les souris ne souffraient pas au cours de ces procédures

(prise de poids et comportement normaux). Le nombre de souris a été réduit au minimum, 30 souris seront nécessaires.

1469- En élevage porcin, le portage digestif de souches de *Escherichia coli* multi-résistantes aux antibiotiques et en particulier de souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération, productrices de bêta-lactamases (enzymes) à spectre élargi (BLSE), constitue un danger car ces souches peuvent diffuser entre animaux, de l'animal vers l'éleveur et vers l'environnement et de l'animal vers le consommateur lors de contaminations des denrées alimentaires. Ces souches multi-résistantes peuvent être pathogènes ou peuvent transmettre leurs gènes de résistance à d'autres souches pathogènes pour l'animal ou pour l'homme. Nous recherchons donc une solution pour limiter le portage digestif de souches de *E. coli* résistantes. Des essais précédents nous ont permis de montrer que l'administration de la souche de *E. coli* ED1a, souche non pathogène, sensible aux antibiotiques et fortement colonisatrice, réduisait, dans certains cas, le portage d'une souche de *E. coli* non pathogène, multi-résistante déjà présente chez les animaux lors de l'administration. Nous souhaitons maintenant évaluer l'effet protecteur de l'administration de la souche *E. coli* ED1a à la truie puis au porcelet, vis-à-vis d'une contamination par une souche multi-résistante inoculée juste après le sevrage des porcelets. Une étude *in vitro* ne permettant pas d'évaluer cet effet protecteur une expérimentation sera conduite en animaleries protégées sur des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés. Un total de 24 porcelets issus de deux truies traitées et de deux truies non traitées par la souche ED1a (administration par voie orale) seront élevés et recevront, ou non, par voie orale, la souche ED1a de la naissance jusqu'au

sevrage. Juste après le sevrage, tous les porcelets seront inoculés par voie orale avec la souche E. coli multi-résistante productrice de bêta-lactamases à spectre élargi. Des prélèvements de matières fécales seront collectés régulièrement sur les truies et les porcelets, pour contrôler l'implantation de la souche ED1a, et comparer les niveaux de portage de la souche multi-résistante chez les porcs ayant reçu ou non la souche ED1a.

Une analyse statistique permettra d'évaluer l'impact de l'administration aux truies puis aux porcelets de la souche ED1a sur le nombre de bactéries et de gènes de résistance présents dans les matières fécales des porcs contaminés juste après le sevrage. Le nombre total d'animaux utilisés sera de 28. Les animaux seront observés quotidiennement. Outre les analyses effectuées sur les matières fécales, les porcelets seront pesés chaque semaine et leur croissance sera comparée. Les animaux seront euthanasiés à l'issue de l'expérimentation, Le protocole ne doit pas entraîner de souffrance animale. Il n'est donc pas attendu de symptomatologie significative lors de cette expérimentation. Si toutefois l'infection conduisait à une altération de l'état de santé, les animaux concernés seront euthanasiés.

1470- Ce projet consiste à évaluer l'activité anti-tumorale de différentes approches thérapeutiques dans des modèles de tumeurs obtenues par greffe de matériel biologique d'origine tumorale dans les tissus superficiels (en général sous-cutanés) de rongeurs (rat ou souris), la souris étant l'espèce animale la plus utilisée.

Une masse tumorale se forme alors progressivement au site d'implantation. Le pourcentage de prise de greffe est très variable d'un modèle à l'autre (50 à 100%) ; par conséquent il est nécessaire d'adapter le nombre d'animaux à planter de manière à disposer d'un nombre d'animaux suffisant en cours d'étude (pour chaque étude de ce projet, il faut 10 animaux par groupe). L'efficacité anti-tumorale d'une approche thérapeutique est déterminée par l'évolution de la croissance tumorale chez des animaux traités par rapport à des animaux non traités (ou recevant le véhicule ayant servi à formulation des produits testés) ou recevant un traitement de référence (en général pour chaque étude de ce projet, 4 groupes d'animaux ; soit un nombre prévisionnel maximum de 4800 animaux sur 5 ans).

Remplacement : malgré l'effort constant de développement de méthodes alternatives pour limiter le recours à l'expérimentation sur les animaux, il existe actuellement de nombreuses questions scientifiques en oncologie, notamment concernant l'évaluation pharmacologique des candidats médicaments anti-tumoraux, auxquelles il n'est possible de répondre que par l'étude de la croissance de tumeurs in vivo. Il n'existe effectivement pas de méthode de substitution adaptée (in vitro ou in silico) pour répondre aux objectifs de ce projet. A ce jour, la souris et le rat sont les espèces qui sont les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- le suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le suivi non-invasif des tumeurs notamment par imagerie
- la recherche de points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire

1471- Les maladies infectieuses (respiratoires, diarrhéiques, nosocomiales,...) sont responsables de 43% des décès dans les pays en développement et de 2% des décès dans les pays développés. En France et dans les pays développés, les décès dus aux maladies infectieuses ont très nettement diminués grâce à une amélioration des conditions de vie, de nutrition et des systèmes sanitaires mais également grâce au développement et à l'accessibilité à un large panel de solutions thérapeutiques (antibiotiques, vaccins). Cependant, depuis quelques décennies, le retour de maladies infectieuses disparues et l'émergence de maladies nouvelles ont été observés. Les principaux facteurs responsables sont les changements sociétaux qui ont conduits à l'apparition de résistance aux antibactériens de nombreux pathogènes. Des progrès thérapeutiques doivent donc encore être réalisés afin de découvrir de nouvelles molécules antibactériennes ou d'optimiser l'utilisation de molécules déjà existantes.

Ce projet a pour objectif de développer et de caractériser des modèles infectieux chez la souris et le lapin, à travers différentes modalités d'infection : infection liée à la pose d'un dispositif médical ou infection d'un organe/tissu (peau, muscle, poumons...) dans le but d'évaluer l'efficacité de différents produits antibactériens sur ces modèles.

Lors de ce projet, l'imagerie médicale sera utilisée afin de suivre l'infection (bactéries rendues bioluminescentes) et/ou la biodistribution de produits antibactériens (produits couplés à une molécule fluorescente). Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement l'anesthésie des animaux) et ne nécessitent pas de sacrifice d'animaux au cours du temps (suivi des mêmes animaux au cours du temps - diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire.

Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre de groupe sera variable, pour chaque étude, en fonction du nombre de conditions expérimentales à tester. Un nombre maximal de 2000 souris et 400 lapins (environ 40 animaux par étude), dans l'ensemble du projet, pourra être utilisé. Un nombre minimum de 6 animaux par groupe sera prévu afin de pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'efficacité et/ou la biodistribution de produits antibactériens dans un organisme entier vivant.

L'espèce souris a été choisie car c'est un modèle standard polyvalent qui est régulièrement utilisé dans les études d'infectiologie. L'espèce lapin a quant à elle été choisie afin de tester l'efficacité de produits antibactériens dont l'efficacité a déjà été testée chez la souris.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mises en place de traitement ou mise à mort des animaux) le plus rapidement possible.

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles molécules antibactériennes.

1472- Ce projet consiste à évaluer l'activité anti-tumorale de différentes approches thérapeutiques dans des modèles de tumeurs mammaires obtenues par greffe de matériel biologique d'origine tumorale directement dans la glande mammaire de rongeurs (rat ou souris), la souris étant l'espèce animale la plus utilisée. Cette implantation dite orthotopique peut être réalisée selon 2 modes d'injection distincts : l'injection dans le tissu adipeux (mammary fat pad en anglais) ou l'injection intracanalair (dans le canal galactophore - intraductal en anglais).

Ces 2 modes d'injections permettent de mimer la réalité clinique de manière plus exacte qu'une implantation sous-cutanée (mode d'injection le plus courant) puisque la croissance tumorale est influencée par le microenvironnement. Les tumeurs qui se développent ainsi au niveau de la glande mammaire montrent des caractéristiques phénotypiques (histologiques) proches des tumeurs retrouvées chez les patients, et les cellules tumorales ont la possibilité de migrer à distance de leur site d'implantation pour former des métastases.

Ainsi, après implantation, les cellules tumorales vont se multiplier d'abord localement pour former progressivement une ou plusieurs masses tumorales, puis dans certains cas, des métastases se développent dans d'autres organes (principalement les os, le foie, les poumons et le cerveau). Le suivi de la progression tumorale pourra se faire par mesure de la masse tumorale superficielle se formant au niveau de la glande mammaire, à l'aide d'un pied à coulisse. Les techniques d'imagerie in vivo non-invasive comme la bioluminescence, la fluorescence ou l'IRM permettent également un suivi longitudinal de la croissance tumorale et du processus de métastase.

Le pourcentage de prise de greffe est très variable d'un modèle à l'autre (50 à 100%) ; par conséquent il est nécessaire d'adapter le nombre d'animaux à planter de manière à disposer d'un nombre d'animaux suffisant en cours d'étude (pour chaque étude de ce projet, le nombre d'animaux par groupe est généralement de 10). L'efficacité anti-tumorale d'une approche thérapeutique est déterminée par l'évolution de la croissance tumorale chez des animaux traités par rapport à des animaux non traités (ou recevant le véhicule ayant servi à formulation des produits testés) ou recevant un traitement de référence (en général pour chaque étude de ce projet, 4 groupes d'animaux ; soit un nombre prévisionnel maximum de 2400 animaux sur 5 ans : 4 groupes x 20 souris pour tenir compte d'une prise de greffe de 50% x 6 études par an x 5 ans).

Remplacement : Malgré l'effort constant de développement de méthodes alternatives pour limiter le recours à l'expérimentation sur les animaux, il existe actuellement de nombreuses questions scientifiques en oncologie, notamment concernant l'évaluation pharmacologique des candidats médicaments anti-tumoraux, auxquelles il n'est possible de répondre que par l'étude de la croissance de tumeurs in vivo. Il n'existe effectivement pas de méthode de substitution adaptée (in vitro ou in silico) pour répondre aux objectifs de ce projet. A ce jour, la souris et le rat sont les espèces qui sont les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- le suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le suivi non-invasif des tumeurs notamment par imagerie
- la recherche de points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire

1473- Le projet d'expérimentation animale présenté dans ce dossier vise à créer au moins 2 lignées stables porteuses d'une mutation différente invalidant la fonctionnalité du gène codant pour le récepteur de la folliculostimuline (fshr) chez le zebrafish. Ces lignées constitueront des modèles animaux d'intérêt majeur pour comprendre le rôle de la Fsh dans la régulation des fonctions gonadiques chez les poissons.

Pour générer des mutations ciblées sur le gène fshr, nous utiliserons la technique d'invalidation appelée CRISPR/Cas9 dont l'efficacité a été démontrée chez plusieurs espèces incluant le zebrafish. Le nombre d'animaux nécessaires au projet est de 600 poissons zèbres (*Danio rerio*) afin de tenir compte de l'efficacité variable de la technique de mutation choisie et de la mortalité observée au cours des procédures d'élevage standard de cette espèce modèle.

Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car il n'existe pas d'inhibiteur spécifique du récepteur fshr qui pourrait être testé en culture d'explants.
- Réduction : Le nombre d'animaux est adapté au plus juste en fonction de l'efficacité attendue des techniques utilisées et de la survie des animaux en élevage.

- Raffiner : La mutation du gène fshr ne devrait pas être létale ni engendrer de malformations pour l'animal car ce gène est exprimé très majoritairement dans la gonade. En fait, seuls les animaux F2 homozygotes pour la mutation devraient être stériles. Le protocole expérimental préconise l'euthanasie prématurée des larves en cas de malformations ou de comportements anormaux des animaux injectés.

1474- Lorsqu'un doigt ou un segment de membre a été sectionné totalement ou en partie, il est parfois possible de le réimplanter avec succès. Il s'agit toujours d'une intervention longue (3 à 6 heures), qui consiste à réparer successivement tous les éléments anatomiques. La réparation des vaisseaux est le temps le plus important pour la survie du doigt. Pour que le sang circule à nouveau, il faut au moins une artère pour l'amener et une veine pour le faire repartir. Les vaisseaux sont réparés sous microscope.

Cette chirurgie réparatrice est réalisée dans des centres spécialisés dans la prise en charge et le traitement des urgences de la main. Les internes en orthopédie, souhaitant travailler dans ces centres, doivent détenir un diplôme universitaire de microchirurgie. Ce diplôme est réalisé dans le cadre de la formation continue et doit permettre aux internes de repousser progressivement leurs limites manuelles sous microscope opératoire. Le but est d'acquérir, outre la maîtrise des gestes et techniques, l'adaptabilité nécessaire en pratique clinique.

Après avoir suivi un enseignement théorique en microchirurgie médicale, des protocoles d'entraînement aux techniques chirurgicales de sutures nerveuses et vasculaires sont réalisés chez le rat car le diamètre de leurs vaisseaux correspond au plus petit calibre de vaisseau que les chirurgiens auront à anastomoser chez l'homme.

Un total de 15 rats est nécessaire par étudiant et par année universitaire, les promotions accueillant en moyenne de 2-8 étudiants, le nombre maximum de rats utilisés sera de 600. Les rats Sprague Dawley sont anesthésiés et plusieurs types d'interventions sont réalisés:

- l'anastomose termino-terminale sur l'artère carotide commune ;
- l'anastomose termino-terminale sur l'artère fémorale ;
- le pontage de l'artère carotide commune par la veine jugulaire externe

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3R:

- Afin de remplacer au maximum l'utilisation de rats, les internes apprennent à travailler dans un premier temps sous microscope opératoire en effectuant des points de sutures sur des cuisses de poulet. Lorsque la phase d'apprentissage est acquise, ils vont ensuite travailler sur des rats anesthésiés.

- Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum, deux interventions étant prévues par animal après une récupération d'au moins 4 semaines entre les deux interventions.

- Les procédures respectent le principe de raffinement avec une gestion de l'analgésie post-opératoire, en limitant le nombre de gestes invasifs réalisés chez le rat et en ayant déterminé des points limites adaptés.

1475- Les plaquettes jouent un rôle primordial de protection de l'intégrité vasculaire, et donc contre les hémorragies. L'interleukine 21, ou IL-21, régule de nombreux processus immunologiques. Des essais cliniques d'administration de cette protéine chez l'homme montre un effet indésirable, qui se manifeste par une diminution du nombre de plaquettes sanguines. Pourtant, les expériences in vitro indiquent que l'IL-21 favorise l'expansion des mégacaryocytes, des cellules de la moelle aussi présentes dans la rate et, impliquées dans le remplacement des plaquettes. La littérature montre que chez la souris, l'IL-21 peut entraîner une splénomégalie, un organe par ailleurs réputé pour capturer et/ou retenir les plaquettes. Par ailleurs, l'IL-21 agit sur les macrophages, des cellules localisées dans la rate et le foie, impliquées dans l'élimination des plaquettes circulantes.

Le but de ce projet est de vérifier que la rate est directement impliquée dans la baisse de la quantité de plaquettes sanguines occasionnée par l'IL-21. Il s'agira de comparer des animaux à qui la rate aura été enlevée à des animaux qui auront suivi une procédure chirurgicale semblable mais sans aller jusqu'à la splénectomie. Après une semaine de récupération, les animaux recevront par injection hydrodynamique un vecteur d'expression vide, ou exprimant l'IL-21 murine. Les plaquettes sanguines seront suivies par prélèvement sanguin pendant les jours qui suivent, puis les animaux seront sacrifiés pour réaliser des analyses cytologiques. Selon les résultats, des expériences complémentaires de déplétion de macrophages pourront être réalisées.

Réduction du nombre d'animaux.

Les expériences seront réalisées en minimisant autant qu'il en est possible le nombre d'animaux par condition expérimentale, pratiquement 6. Les expériences seront réalisées dans l'optique de déduire le maximum d'informations scientifiques par test, pour cette raison en fin d'expérimentation, les tissus seront prélevés sur les animaux sacrifiés pour analyser leurs paramètres biologiques.

Raffinement.

Les animaux seront anesthésiés pour toutes les procédures expérimentales, excepté pour l'infection hydrodynamique qui nécessite une circulation sanguine normale. D'après la littérature, la splénomégalie induite par l'IL-21 se développe en 5 à 7 jours, nous pensons donc pouvoir réaliser les expériences dans des laps de temps, à la suite de quoi les animaux seront sacrifiés. Les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout comportement d'inconfort. L'expérimentation sera arrêtée pour les animaux manifestant une souffrance au-delà d'un seuil préétabli.

Le nombre d'animaux prévus est de : 72 ou 216 souris, selon que les expériences complémentaires de déplétion des macrophages ne seront pas, ou seront réalisées.

1476- Les bovins sont régulièrement utilisés pour la recherche biomédicale dans le domaine de la santé animale. Ils sont notamment inclus dans des études de pharmacocinétique dont le but est de suivre la concentration d'un produit d'intérêt médical dans le sang au cours du temps.

En tant que sous-traitant de l'industrie pharmaceutique, nous proposons à nos clients de réaliser la phase expérimentale de leurs études.

L'enjeu de ce projet est donc la réalisation des études de pharmacocinétique chez les bovins, en administrant aux animaux un traitement à tester et en pratiquant ensuite des prélèvements sanguins, soit par ponction directe, soit en utilisant un cathéter intraveineux par lequel on peut aspirer du sang.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire la diffusion d'un produit dans le sang des animaux, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier un produit.

Au maximum pour ce projet, nous prévoyons de réaliser la phase animale des études pharmacocinétiques de 60 produits au maximum, en 5 ans.

Chaque produit à tester fera l'objet d'une étude particulière. On calculera pour chaque étude le nombre d'animaux nécessaires, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus. Par ailleurs des études préliminaires aux études de pharmacocinétiques pourront permettre des mises au point de la technique de pose des cathéters, de manière à l'adapter aux études ultérieures.

Au total, au maximum 800 animaux pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet. Le mode d'administration des produits sera fonction du produit à tester mais toujours conforme aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les prélèvements sanguins seront toujours réduits au minimum. Ils pourront être réalisés par ponction avec une aiguille de la veine jugulaire ou de la veine caudale.

Cependant, il sera possible pour éviter de trop multiplier les ponctions source de stress et de douleur de poser un cathéter intraveineux par lequel on pourra aspirer du sang et qui restera à demeure pendant toute la période des prélèvements sanguins.

L'hébergement individuel pourra dans ce cas être requis afin d'éviter que les animaux ne s'arrachent leurs cathéters, une attention particulière sera alors portée au raffinement et à l'enrichissement du milieu pour éviter l'ennui : contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement...

1477- Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les effets bénéfiques de candidats-médicaments dans un modèle animal mimant certains aspects du syndrome de stress post-traumatique, syndrome rencontré chez l'homme suite à des événements traumatiques majeurs (soldats revenants de conflits, agressions ...).

Pour cela, au cours de chaque étude, des souris seront soumises à un stress (par une courte mise en contact avec leur prédateur naturel, le rat), puis leur comportement locomoteur et leur anxiété seront évalués jusqu'à 7 jours après le stress (en général 6 groupes avec n=10 animaux/groupe, soit un nombre prévisionnel de 1800 souris et de 180 rats sur 5 ans). Le candidat médicament sera en général administré après le stress (pour mimer la situation clinique), l'objectif étant de détecter des molécules permettant de réduire l'état anxieux des souris. A la fin de chaque étude, des prélèvements de sang ou de tissus pourront être effectués.

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur l'anxiété. Or avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, la souris est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures peu invasives
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

1478- Le gène Prnp code pour la protéine PrP dont une forme anormalement repliée est responsable des pathologies à Prion qui touchent tant l'homme que les animaux. La protéine PrP serait également impliquée dans d'autres anomalies neurologiques humaines, comme la maladie d'Alzheimer. La protéine PrP dérive d'une famille protéique de transporteurs d'ions (ZIP) et deux protéines apparentées existent chez les mammifères, la protéine Doppel (codée par le gène Prnd) et la protéine Shadoo (codée par le gène Sprn). La fonction biologique de ces trois protéines reste énigmatique et les mécanismes liant la PrP aux pathologies associées sont encore peu connus. La compréhension de cette fonction pourrait avoir des retombées importantes tant pour la recherche fondamentale que dans des domaines appliquées, notamment en santé humaine et animale.

L'absence de phénotype marqué des souris invalidées au locus Prnp ou Sprn peut suggérer une redondance fonctionnelle entre ces protéines. Le but de ce projet est d'analyser l'incidence de l'invalidation simple mais surtout de la co-invalidité de ces loci sur un fond génétique pur FVB/N provenant d'élevages autorisés, en s'appuyant sur de nouvelles stratégies d'invalidation à l'aide de nucléases chez la souris. Ces nouveaux modèles animaux pourraient permettre enfin de comprendre

le rôle de ces gènes, non seulement dans le tissu nerveux, mais aussi dans de nombreux autres organes où ils sont exprimés. De fait, l'utilisation de ces animaux modèles est la seule option pour étudier l'ensemble de ces tissus et leur interaction au cours du développement. Au total, ce projet utilisera environ 700 souris, nombre nécessaire et suffisant pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables à l'aide de protocoles expérimentaux spécialement adaptés (utilisation d'un fond génétique pur, de croisements raisonnés, analyses phénotypiques pluritissulaires, ..). Ces animaux seront étroitement surveillés pour s'assurer de leur bien être et les protocoles expérimentaux utilisés ont été choisis pour éviter toute souffrance. Le nombre d'intervention sur animal a été réduit au minimum et s'accompagne, de l'utilisation de protocoles d'anesthésie et d'analgésie déjà validés sur ces animaux de laboratoire.

Ce projet devrait donc permettre d'identifier avec un nombre restreint d'animaux les tissus où ces protéines exercent un rôle majeur, et dériver par la suite sur la mise en place de modèles *in vitro* ciblés et adaptés.

1479- Ce projet concerne le développement de produits immunologiques destinés à protéger le chat contre plusieurs maladies mortelles ou non.

La réalisation de ce projet comprend dix procédures expérimentales permettant d'évaluer :

- l'innocuité de l'administration d'une dose et d'une dose répétée,
- l'innocuité de l'administration d'une surdose,
- l'efficacité des différentes indications de ces produits immunologiques.

Ce projet requiert au maximum l'utilisation de 526 chats.

S'agissant d'un projet en phase d'évaluation (stade précoce du développement d'un produit immunologique), celui-ci s'appuie sur les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne. Les exigences de remplacement, raffinement et réduction (3R) seront considérées à travers :

- l'observation quotidienne des animaux,
- l'hébergement en groupe et l'enrichissement des box,
- un nombre d'animaux strictement conforme aux recommandations des textes de référence,
- la définition de points limites adaptés pour éviter toute souffrance ou douleur inutile à un animal.

1480- Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez les autres rongeurs dont la gerbille, lorsque ces espèces sont utilisées au cours du développement préclinique de la molécule (pharmacocinétique).

Pour cela, au cours de chaque étude, des prélèvements sanguins répétés sont réalisés sur l'animal anesthésié après l'administration du candidat-médicament et éventuellement du véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée (en général 4 groupes avec 3 animaux par groupe ; soit un nombre prévisionnel maximum de 900 animaux sur 5 ans). Ces prélèvements de sang sont utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (expérience *in vitro*) pour étudier la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Or avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. L'étude pharmacocinétique est donc une étape importante, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chance d'être développée. De façon générale, les études de pharmacocinétiques sont effectuées chez deux groupes d'animaux, les rongeurs d'une part (dont la gerbille) et les gros mammifères d'autre part (chien, primate non humain).

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures peu invasives
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

1481- Les maladies du système nerveux (Parkinson, Alzheimer, Huntington) et les autres altérations cérébrales liées à l'âge sont une préoccupation croissante en santé publique. Ces pathologies sont toutes liées à l'apparition d'une atrophie cérébrale massive et à des atteintes telles qu'une perte de l'intégrité fonctionnelle des réseaux neuronaux. La compréhension des mécanismes en jeu est donc très importante pour permettre une meilleure prise en charge des patients. L'atrophie et de nombreuses autres atteintes cérébrales liées à l'âge peuvent être suivies de façon non-invasive grâce à des nouveaux outils diagnostiques tels que l'imagerie par résonance magnétique.

Des atteintes sanguines peuvent également être détectées lors du vieillissement. Par exemple, la protéine amyloïde qui est présente en grande quantité (anormale) dans le cerveau des patients Alzheimer, est aussi détectable dans le sang. Les relations entre atrophie cérébrale, atteintes cérébrales fonctionnelles et altérations sanguines sont encore mal connues.

Par ailleurs, la recherche de procédures retardant le vieillissement est d'un intérêt majeur pour aider nos populations à mieux vieillir. La restriction calorique et les traitements par des polyphénols sont deux des approches les plus prometteuses.

L'objectif de ce projet est de suivre l'atrophie cérébrale et d'autres atteintes cérébrales liées à l'âge, par exemple les altérations fonctionnelles des réseaux neuronaux, grâce à l'imagerie par résonance magnétique. Des analyses sanguines permettront de corréliser les atteintes cérébrales avec des paramètres biologiques tels que l'amyloïde plasmatique et/ou l'urémie. Dans le cadre d'une prestation réalisée dans notre laboratoire sur une cohorte d'animaux en restriction calorique ou sous polyphénol, nous étudierons aussi les modulations de l'atrophie cérébrale liées à ces thérapies.

Nous utiliserons un modèle de primate non humain (PNH) présentant un vieillissement cérébral très proche de celui de l'homme. Par exemple, il présente une atrophie cérébrale liée à l'âge et est le premier PNH chez qui l'atrophie a été corrélée aux atteintes cognitives. Les animaux âgés présentent aussi des modifications sanguines pouvant refléter des altérations précoces retrouvées chez les patients Alzheimer. Les modèles rongeurs de pathologies neurodégénératives ne présentent pas d'atrophie cérébrale en vieillissant. Ils peuvent cependant présenter des atteintes cérébrales fonctionnelles ou des altérations sanguines. Leur utilisation peut donc être très utile pour mettre au point les protocoles expérimentaux permettant de mesurer les atteintes cérébrales fonctionnelles liées à l'âge ou des altérations sanguines. Cela explique l'utilisation de rongeurs dans nos procédures.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des élevages agréés. Le projet prévoit l'utilisation de 100 PNH et de 70 rongeurs. Ces effectifs ont été réduits au minimum nécessaire pour garantir la validité statistique des résultats. Le recours à l'animal est nécessaire car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules. Les modèles rongeurs sont utilisés pour préparer les études menées chez le PNH.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés pour les rongeurs et les primates non humains depuis de nombreuses années, et validés par un vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux, hébergés en groupe dans un milieu enrichi, garantissent leur bien-être.

1482- Obésité et DT2 sont deux facteurs de risques de maladies cardiovasculaires (MCV) qui sont difficilement dissociables l'une de l'autre, ce qui complexifie les interprétations des mécanismes physiologiques du Diabète de type 2 (DT2) seul. Elles majorent la morbidité et la mortalité en entraînant des désordres métaboliques dont la résistance à l'insuline des tissus périphériques (foie, muscles, tissu adipeux). Les modèles animaux de DT2 présentent généralement un syndrome métabolique et surtout de l'obésité, ce qui rend difficile la mise en place d'un programme d'entraînement physique (souche Zucker par exemple...). Or un des moyens de prévenir l'installation de ces facteurs de risques consiste à s'astreindre à une activité physique régulière quotidienne. La souche Goto-kakisaki est un exemple de modèle de rat DT2 sans obésité qui est intéressante pour tester l'effet de l'exercice physique sur le diabète seul. Cependant cette souche n'est pas commercialisée en France et n'est pas facilement accessible. C'est pourquoi, nous avons développé un modèle de jeunes rats wistar dont le régime est enrichi en fructose durant 12 semaines consécutives. Les résultats montrent que ces animaux présentent un pré-DT2. Sur ces animaux pré-DT2, nous avons également pu mettre en place de l'activité physique chronique modérée en se dédouanant des problèmes biomécaniques induits par l'obésité lors d'une course sur tapis roulant comme pour les autres modèles d'animaux existants.

Avec cette demande de projet, nous souhaitons, en plus de sa validation, caractériser et valoriser ce modèle sur une période d'induction du DT2 à plus long terme (21 semaines), pour simuler le développement lent et insidieux de cette maladie. Nous souhaitons travailler à la fois sur l'organisme entier et sur des cultures de cellules primaires issues de rats présentant ce DT2 afin d'étudier les mécanismes "intimes" de régulation de ce facteur de risque. Deux groupes seront constitués : les animaux sédentaires (Sed, n=20) et les animaux sédentaires dont l'eau de boisson est enrichie en fructose (Sed FF, n=30), soit un total de 50 animaux.

L'effet de l'entraînement physique chronique sur ce même protocole d'induction du diabète fera l'objet d'une demande d'autorisation ultérieure.

Nous travaillons dans le souci de la règle des 3 R :

* Réduction : le nombre d'animaux est réduit au minimum statistique requis pour mener à bien ce projet.

* Raffinement : tout au long du protocole, les conditions de stabulation sont réalisées dans un souci de bien-être de l'animal. Toutes les procédures expérimentales sont réalisées par des personnes formées et habituées à travailler avec des animaux de laboratoire, dans des conditions d'analgésie et d'anesthésie conforme à la réglementation.

* Remplacement : L'utilisation du modèle murin est inévitable car nous travaillons sur les mécanismes intégratifs et donc sur l'organisme entier.

1483- Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez le primate lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique). Le devenir de cette molécule peut être étudié dans différents tissus ou liquides biologiques (exemple sang, lymph, etc). Dans le cadre de ce projet, le suivi de la molécule dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) sera réalisé. Le LCR est un liquide qui baigne le cerveau et la moelle épinière et en assure entre autres une protection mécanique. Certaines molécules administrées par voie orale, intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée se retrouvent dans le sang et peuvent traverser la barrière hémato-céphalée pour se retrouver dans le LCR.

Pour suivre l'évolution de la concentration de la molécule étudiée dans le LCR au cours du temps, des prélèvements de LCR sont réalisés chez le primate anesthésié à différents temps après l'administration du candidat-médicament (6 animaux par étude ; soit un nombre prévisionnel maximum de 60 animaux sur 5 ans).

Ces prélèvements sont ensuite traités et analysés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites dans le LCR.

Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 72 heures de récupération entre 2 administrations, ce qui permet de raffiner l'expérience.

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le primate car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer la pharmacocinétique d'une nouvelle molécule dans le LCR. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le primate est une des espèces de non-rongeurs adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. D'autre part, les animaux peuvent être utilisés à plusieurs reprises pour tester différentes doses du candidat médicament ou différentes molécules.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures peu invasives réalisées sous anesthésie
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

1484- Le choc hémorragique est caractérisé par une perte brutale de sang qui compromet l'apport en nutriments et en oxygène aux organes. La cause d'hémorragie la plus fréquente et la plus grave est traumatique. Le traumatisme et l'anémie aigue hémorragique ont des effets délétères synergiques. Le choc hémorragique touche des sujets jeunes, victimes d'accidents ou d'agressions. Malgré les avancées de la réanimation, l'hémorragie reste à l'origine de 40% des décès des traumatisés graves. C'est la principale cause de décès évitable chez le traumatisé.

Pour maintenir en vie les patients en attendant le contrôle chirurgical du saignement, la prise en charge du choc hémorragique vise à conserver une perfusion minimum des organes vitaux. Pour cela, il faut administrer du remplissage vasculaire dès le début de la prise en charge en ciblant des objectifs hémodynamiques simples exprimés en niveau de pression artérielle. Cette phase vise un compromis entre maintenir un apport minimum en oxygène aux organes vitaux et éviter une majoration du saignement des brèches vasculaires par une augmentation trop importante de la pression artérielle. Les objectifs définis dans les recommandations européennes sont exprimés en objectif de pression artérielle systolique (PAS) ou en objectif de pression artérielle moyenne (PAM) en cas de traumatisme crânien associé. Cependant, l'administration de remplissage vasculaire n'est pas standardisée. Il est recommandé d'en perfuser le minimum nécessaire pour éviter de diluer les facteurs de coagulation et ne pas dépasser les objectifs fixés, ce qui est relativement fréquent compte tenu de l'inertie de la réponse hémodynamique. La stratégie de réanimation comprend également l'administration de catécholamines pour améliorer la défaillance hémodynamique et limiter le remplissage vasculaire. Ces drogues sont complexes à manipuler. Nous développons actuellement un dispositif de traitement automatisé du choc hémorragique permettant d'administrer automatiquement les thérapeutiques nécessaires. Nous pensons qu'il peut optimiser la prise en charge hémodynamique en apportant la quantité de traitement nécessaire tout en évitant les sous et surdosages. Dans ce contexte il est maintenant indispensable de valider ce dispositif avant de le proposer comme outil thérapeutique chez nos patients. Et pour cela, le modèle animal reste incontournable.

80 rats Wistar maximum seront nécessaires à la réalisation des 2 phases de ce projet.

Le recours à l'analgésie et à l'anesthésie sera systématique pour limiter au maximum

l'inconfort de l'animal. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, cette étude sera réalisée après une série de test in vitro sur simulateur (poche avec circuit semi ouvert). Toutefois, une étude sur petit animal est le pré-requis pour la réalisation des tests sur animal plus gros et plus proche de l'homme (porc). Nous avons choisi un choc hémorragique contrôlé pour la première phase de l'étude car il présente moins de variabilité que les modèles non contrôlés, est très reproductible et nécessite donc moins d'animaux. Néanmoins, afin de se rapprocher des situations cliniques un modèle non contrôlé reste nécessaire pour la dernière phase de l'étude.

1485- Chez quelques espèces animales, dont les espèces aviaires, les spermatozoïdes déposés dans l'appareil reproducteur de la femelle au cours de l'accouplement sont stockés et maintenus en vie pendant de très longues périodes. Ce modèle de survie prolongée des cellules reproductrices mâles est un excellent modèle pour concevoir des systèmes de conservation de cellules in vitro dans une large gamme d'applications pratiques et thérapeutiques. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont des poules appartenant à 2 lignées divergentes en termes de durée de période fertile qui sont entretenues depuis de nombreuses années. La lignée DPF- se caractérise par une durée de période fertile courte (10 jours environ) alors que la lignée DPF+ a une durée de période fertile longue (21 jours environ).

Dans le cadre de ce projet, le nombre maximum de poule (pubères virginisées) sera de 60 (30 par lignée). Elles seront toutes inséminées artificiellement le même jour avec du sperme de coq. Le nombre (n=60) est nécessaire afin d'étudier un groupe présentant une variabilité inter-individuelle et permettre le choix ultérieur d'animaux présentant des phénotypes extrêmes, les plus intéressants pour répondre à notre question (3R - Réduire). Quotidiennement pendant 3 semaines les œufs sont récoltés individuellement et mis en incubation. Au terme de 4 semaines de collecte, nous disposerons pour chacune des 60 poules de sa cinétique de ponte et de sa cinétique de production d'œufs fécondés, duquel nous pouvons déduire sa capacité à

conserver les spermatozoïdes au cours du temps. Ce type d'expérimentation est réalisé en vue d'obtenir et d'exploiter des informations sur le phénotype de chaque individu (taux de ponte, fertilité, durée de période fertile); ce qui nécessite l'entretien des animaux en cages individuelles. Les animaux sont en cages individuelles ajourées (grilles de séparation) et contiguës, permettant le contact visuel et vocal, ainsi que des contacts légers par le bec. De plus, les cages seront enrichies en y plaçant un petit objet qui servira de jouet à picorer (3R – Raffinement). Elles sont équipées d'un système d'abreuvement et d'alimentation adapté à l'espèce. Les poules seront logées dans une pièce conditionnée (20°C, 14h d'éclairage/jour), et vont recevoir quotidiennement plusieurs visites des soigneurs, des praticiens ou des concepteurs pour, par exemple : le ramassage des œufs, l'approvisionnement en nourriture et en eau, le nettoyage de la pièce et des cages, ce qui permet l'inspection visuelle de la bonne santé de chaque animal. Dans chaque lignée, 10 poules seront sélectionnées en fonction de leurs paramètres de reproduction et subiront un prélèvement du fluide utérin à deux moments, une fois avant et une fois 24h après insémination. Il s'agit d'une méthode non invasive puisque le fluide d'oviducte est récupéré par la voie naturelle, mais qui nécessite l'injection intraveineuse de 50 µg de prostaglandines PGF2 alpha pour favoriser sa collecte. Le volume recueilli varie de 0.1 à 1 ml selon les animaux. Chaque poule sera prélevée individuellement 10 heures après ovoposition. Suite aux recueils de fluide utérin, cinq poules par lot seront euthanasiées pour permettre le recueil de tissus biologiques afin d'étudier les sites de synthèse et l'expression des acteurs moléculaires impliqués. Les 50 poules restantes retourneront à l'élevage. Ce type d'expérimentation ne peut être réalisé qu'in vivo et ne peut pas faire l'objet d'un remplacement par une méthode alternative (3R – Remplacement).

1486- La formation du cortex cérébral dépend de la mise en place, lors du développement embryonnaire, des différents types neuronaux (neurones excitateurs ou interneurons, ces deux types étant issus de neuroprogéniteurs distincts). Ces neurones subissent des migrations, régulée de manière spatio-temporelle, afin d'atteindre leur localisation au sein du cerveau mature. La perturbation de ces migrations neuronales peut entraîner des anomalies corticales, défauts fréquemment observés dans différentes pathologies neurologiques. L'électroporation in utero, consistant à manipuler génétiquement des embryons dans une région cérébrale et à un temps définis, est la seule technique permettant l'étude de la formation du cortex tout en préservant l'environnement du développement utérin.

Le présent projet vise à caractériser les anomalies du développement cortical liées à la maladie de Huntington. Cette maladie neurodégénérative héréditaire est causée par une mutation du gène codant la huntingtine. Les symptômes typiques, apparaissant chez l'adulte, sont une altération profonde et sévère des capacités physiques et intellectuelles (dont un dysfonctionnement moteur progressif, un déclin cognitif et des troubles psychiatriques). Les patients meurent habituellement 15-20 ans après l'apparition des premiers symptômes et il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitements efficaces pour prévenir ou retarder la progression de cette maladie. En France, 12.000 patients sont touchés et environ 6.000 personnes développeront la maladie dans les 20 prochaines années. Développer de nouvelles stratégies thérapeutiques nécessite donc la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie. Ce projet, basé sur l'utilisation de l'électroporation in utero chez la souris, vise à étudier, pendant 5 ans, le rôle de la huntingtine et de sa mutation dans le développement du cortex cérébral et dans la mise en place/fonctionnement des différentes populations neuronales (neuroprogéniteurs/neurones excitateurs et interneurons). Le nombre d'animaux a été déterminé en prenant en compte: (i) les différentes lignées murines génétiquement modifiées nécessaires à l'étude et (ii) en réduisant au maximum le nombre d'animaux utilisés afin d'obtenir des résultats significativement exploitables et valides. Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 1200 femelles gestantes (40 souris par lignée et par an). Etant donné qu'un quart de ces femelles seront opérées durant leur dernier tiers de gestation et que pour chaque femelle opérée, 10 embryons seront électroporés, 3000 embryons seront utilisés dans le cadre de cette procédure. Les expériences seront menées afin de limiter au maximum la douleur de l'animal. Leur état de santé sera ensuite surveillé tout au long de l'expérience afin de déterminer les points limites qui permettront de diminuer ou d'abrèger leur souffrance.

1487- Les antiangiogéniques (AAG) sont devenus un des traitements de référence des cancers. Pour améliorer la survie, les patients sont traités par des AAG sur le long terme. Cependant, des observations cliniques sont notées avec tous les AAG: notamment une HTA (hypertension artérielle) et un retard à la cicatrisation.

Ces deux manifestations traduisent pour partie l'existence d'une microangiopathie, cette dernière correspondant à une altération structurale et fonctionnelle des vaisseaux.

Notre but est de valider cette hypothèse et de caractériser cette microangiopathie.

Notre méthodologie est d'utiliser un modèle murin connu de microangiopathie induisant un retard de cicatrisation: le diabète induit par l'injection de streptozotocine; et de comparer à des souris traitées par AAG.

Les axes d'évaluations de la microangiopathie seront : cerveau, œil, rein, foie, péritoine, poumons et cœur.

Les éléments ci-dessous seront évalués afin de confirmer la microangiopathie et la caractériser :

- Vasoréactivité et densité capillaire (tests hémodynamiques et histologie)
 - Dysfonction endothéliale : Profils protéomiques des cellules endothéliales circulantes ou dans un organe (étude comparative des voies intracellulaires activées par l'hyperglycémie et par l'utilisation des anti-angiogéniques, taux de produit de glycation avancée, l'intégrité mitochondriale) et facteurs de maturation des vaisseaux en RT-PCR (VEGF, PlGF, Ang1, Ang 2)
- Les modèles diabète et traitement AAG sont maîtrisés au laboratoire comme les éléments de caractérisation sus cités.

Pour le projet, nous aurons besoin de 114 souris C57/BL6 mâles.

La variabilité interindividuelle étant importante, le nombre de souris prévu pour chaque groupe est le nombre requis pour que les tests statistiques soient suffisamment puissants.

Des études in vitro sont en cours mais il est nécessaire d'étudier la microangiopathie dans un système intégré, donc in vivo, et voir l'effet des AAG sur l'ensemble des organes.

Les points limites sont les suivants : comportement anormal (yeux fermés, dos voûté, isolement), perte de poids >20%, déshydratation, apparence physique anormale (automutilation, plaies, poil terne). Ces points seront surveillés deux fois par semaine par l'expérimentateur et l'animalier pour permettre de limiter au minimum la douleur de l'animal. Pour les autres jours, les expérimentateurs effectueront une observation quotidienne des animaux.

En cas de signes de souffrance, ils seront mis à mort considérant qu'il s'agit d'un effet néfaste des traitements ou encore de la maladie (le diabète). En effet, un animal en souffrance conduira à une modification des résultats, qu'on ne pourra pas interpréter.

1488- Acquis à la naissance et stabilisé vers l'âge de 3 ans, le microbiote intestinal humain reste remarquablement stable en conditions normales chez l'adulte. Composé de centaines d'espèces intimement adaptées à l'écosystème intestinal, il est en interaction constante avec les cellules, tissus et organes de l'hôte. De nombreuses conditions liées au mode de vie moderne et aux pratiques cliniques constituent néanmoins des facteurs de perturbation de la symbiose microbiote-hôte. Dans le cadre d'une convention de recherche signée en décembre 2014, une StartUp va développer avec l'INRA des processus standardisés et sécurisés pour une reconstruction rapide et complète de la symbiose microbiote-hôte par transplantation de contenus intestinaux.

La transplantation pratiquée aujourd'hui est couramment allogénique, d'un donneur sain vers un receveur malade. Elle est pratiquée depuis plus de 50 ans chez l'Homme avec une guérison totale dans la colite à *Clostridium difficile* chez plus de 90% des patients. La microbiothérapie autologue, pour laquelle le sujet est son propre donneur, pourrait être une alternative dans le cas de perturbations anticipées du microbiote à l'hôpital ou dans la vie courante.

Il y a aujourd'hui une réelle demande des cliniciens et pharmaciens d'hôpitaux pour des processus standardisés de conditionnement des échantillons fécaux pour la transplantation, et un fort potentiel d'amélioration des processus actuels qui respectent mal les exigences physiologiques du microbiote intestinal.

Le présent travail a pour objet de valider in vivo chez le rongeur un processus de collecte et conditionnement de selles humaines pour la microbiothérapie autologue.

Il comporte trois procédures qui impliqueront 176 rongeurs au total :

La procédure 1 vise à analyser l'impact du processus de conditionnement sur l'écologie intestinale reconstruite en rongeurs axéniques. Par comparaison avec un témoin constitué d'une suspension de selles humaines fraîchement collectées et administrées sans conditionnement, des échantillons de ces mêmes selles conditionnés selon diverses méthodes et administrés immédiatement après conditionnement mais aussi après une période de stockage seront testés. Cette procédure utilisera un maximum de 140 souris adultes.

La procédure 2 vise à comparer l'impact de la microbiothérapie autologue par rapport à la transplantation allogénique. Cette procédure utilisera 24 rats adultes.

La procédure 3 vise à évaluer la dynamique d'implantation et de stabilisation d'un microbiote humain dans un modèle de rat axénique.

1489- Les canaux TRPC6 sont des protéines membranaires principalement rencontrées dans les poumons, le cerveau et les reins. En permettant le passage de cations tels que les ions sodium (Na) et calcium (Ca) à travers la membrane cellulaire ils contrôlent de nombreux processus biologiques. Par exemple dans le tissu nerveux, les canaux TRPC6 jouent un rôle dans la croissance des axones, la formation des synapses et la survie neuronale. Des données récentes ont montré que ces protéines formaient des complexes macromoléculaires avec d'autres acteurs protéiques dont la pompe Na/K. Celle-ci est une protéine que l'on retrouve dans tous les types cellulaires et qui est nécessaire au maintien des équilibres ioniques cellulaires. Des expériences de protéomique et de co-immunoprécipitation ont révélé que la pompe Na/K et les canaux TRPC6 seraient associés, mais on ne connaît pas la signification de cette interaction entre ces 2 protéines membranaires dans l'organisme.

Les données obtenues à ce jour proviennent de travaux faits sur des cultures cellulaires et indiquent qu'une diminution de l'activité de la pompe Na/K déclencherait la dégradation des protéines qui lui sont associées. Mais l'on ignore si cette propriété observée in vitro est présente chez l'animal entier. Ce projet vise donc à déterminer si, chez l'animal entier, la pompe Na/K est une protéine capable d'induire la dégradation de protéines membranaires transportant des ions comme par exemple la protéine TRPC6. Il s'agit d'un point important car un nombre croissant de travaux ont mis en évidence le rôle de la pompe et de ses dysfonctionnements dans divers troubles neurologiques et psychiatriques. Il est donc essentiel de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles in vitro mais aussi et surtout in vivo d'une perturbation de l'activité de la pompe Na/K sur le tissu nerveux. Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons l'ouabaïne (molécule d'origine végétale) qui inhibe avec une haute spécificité l'activité de la pompe. L'ouabaïne sera injectée par voie intracérébrale aux animaux puis les protéines seront étudiées par des techniques biochimiques pour déterminer si l'inhibition de la pompe par la ouabaïne a provoqué une dégradation de protéines membranaires dont TRPC6.

Les animaux choisis pour ce projet sont des rongeurs nés et élevés en France. Ils sont hébergés dans une animalerie agréée, dont l'environnement est enrichi, sous la surveillance journalière de personnels qualifiés et expérimentés. Les expériences réalisées à ce jour in vitro sur des cultures neuronales nous ont permis de partiellement disséquer d'un point de vue moléculaire l'interaction entre la pompe et les canaux TRPC6. Il est maintenant essentiel d'aborder cette question au niveau de l'organisme entier pour s'assurer de la validité et de l'importance physiologique de nos résultats. Les rongeurs constituent un modèle de choix pour les injections intracérébrales car les protocoles et les coordonnées stéréotaxiques sont bien établis et

la technique bien maîtrisée. Le nombre d'animaux requis (16) est réduit au minimum nécessaire tout en permettant la réalisation de tests statistiques nécessaires à la validation des résultats. L'expérience sera de courte durée (2h maximum) et les animaux maintenus sous anesthésie seront sous surveillance constante par les expérimentateurs. Les conditions expérimentales du traitement ont été définies sur la base de protocoles déjà publiés selon des critères rigoureux déjà en vigueur dans divers laboratoires internationaux travaillant dans ce domaine.

1490- Les métastases sont supposées être responsables directement ou indirectement de plus de 90% de la mortalité des patients atteints d'un cancer. Les métastases proviennent de cellules de la tumeur primaire, disséminées soit par le sang soit par la lymphe et nécessitant pour leur dissémination la formation de néovaisseaux. L'angiogenèse et la lymphangiogenèse, c'est à dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et lymphatiques à partir de vaisseaux existants, sont deux processus primordiaux dans le développement physiologique normal, mais également dans des pathologies vasculaires ou au cours du développement tumoral et dans la dissémination des métastases.

Nous venons de mettre en évidence un rôle crucial d'un facteur de croissance, la protéine BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9), dans la maturation du réseau vasculaire lymphatique et la formation des valves des vaisseaux collecteurs lymphatiques. La question se pose maintenant de connaître l'implication éventuelle de ce facteur circulant dans la progression tumorale.

Cette étude vise à approfondir la compréhension du rôle de BMP9 et de son récepteur membranaire ALK1 dans la régulation de la lymphangiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques) tumorale et la dissémination de métastases. Cette étude utilisera des modèles rongeurs, soit normaux soit privés de BMP9 chez lesquels seront induites des tumeurs de type mammaire. A l'aide de ce modèle, nous analyserons le développement du réseau vasculaire lymphatique de la tumeur, des ganglions lymphatiques « sentinelles » (les plus proches de la tumeur) et des sites de métastase (poumons, foie et la moelle osseuse). Nous analyserons également si un anticorps neutralisant dirigé contre BMP9 ou la forme soluble du récepteur de BMP9, tous deux capables de bloquer l'action de BMP9, pourrait avoir un effet sur le développement tumoral et la dissémination des métastases et donc être utilisé comme de nouveau médicament.

Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations, importantes pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-tumorales. Le recours à des investigations in vivo est donc nécessaire.

Le modèle rongeur a été choisi pour réaliser cette étude. Les animaux sont nés et ont été élevés dans un établissement agréé. Leur nombre (100) a été déterminé sur la base des données de la littérature et pour répondre aux exigences d'un test statistique (test t de Student) qui sera appliqué pour chaque expérience. Ainsi, nous veillons à n'utiliser que le minimum nécessaire d'animaux pour assurer la validité des résultats.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

1491- L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est couramment utilisée en médecine pour le diagnostic de pathologies. Bien qu'il n'existe actuellement aucun argument en faveur d'un potentiel risque pour la santé, des questions se posent sur une éventuelle nocivité de l'exposition au champ magnétique. De nombreuses études ont été menées pour détecter des effets biologiques des champs magnétiques sur la reproduction et le développement, le système cardiovasculaire et le système nerveux, ainsi que sur la génotoxicité et le risque de cancer. Toutefois, les résultats de ces recherches sont très divergents et peu concluants. Par ailleurs, contrairement aux examens d'imagerie utilisant des rayonnements ionisants, la grossesse ne représente pas une contre-indication lors d'une IRM. A ce jour, il existe peu de preuves scientifiques pour conclure à un éventuel impact du champ magnétique sur l'embryon.

L'objectif de ce projet est d'étudier, sur le modèle rongeur embryonnaire, les effets du champ magnétique sur le développement cérébral, et plus particulièrement sur la formation des nouveaux neurones à partir de cellules souches, phénomène appelé neurogenèse. Des femelles gestantes seront placées dans le tunnel de l'IRM pour être exposées pendant 1 heure ou 3 heures au champ magnétique pour mimer la durée moyenne et maximale d'un examen IRM effectué chez l'Homme. Pour caractériser les conséquences du champ magnétique sur la neurogenèse embryonnaire, nous étudierons à court terme (2h, 4h ou 24h après l'exposition au champ magnétique), les marqueurs cellulaires et moléculaires des cellules souches neurales, afin de quantifier leur progression dans le cycle cellulaire, leur prolifération, leur migration et leur différenciation, ainsi que d'éventuels dommages à l'ADN et mécanismes de mort cellulaire. Les retombées de ce projet sont majeures car il devrait permettre d'apporter des preuves scientifiques pour répondre aux interrogations sur les potentiels risques des champs magnétiques.

Bien que quelques études aient caractérisé in vitro les effets des champs magnétiques sur les cellules souches neurales et les neurones immatures, il est nécessaire d'évaluer ces effets sur un organisme intégré, car la neurogenèse est finement régulée par son microenvironnement, notamment par des interactions avec d'autres types cellulaires environnants et des stimuli intrinsèques et extrinsèques (neurotransmetteurs, facteurs de croissances, hormones...). Notre étude, conçue avec la volonté de respecter les règles éthiques, a été élaborée de manière à pouvoir effectuer nos protocoles sur des lots successifs d'animaux. Cette répartition par lots vise à arrêter l'expérience si un effet significatif est observé avant d'avoir utilisé le nombre maximum d'animaux défini pour ce projet (152 rongeurs adultes nés et élevés en captivité dans un établissement autorisé ainsi que 912 embryons).

Les protocoles d'expérimentation ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Une visite quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer de leur bien-être. Dans le cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou de décider de l'euthanasie.

1492- La maladie des frontières, causée par le pestivirus Border (BDV pour Border Disease Virus), est responsable de pertes économiques considérables dans les élevages ovins, consécutives à des problèmes de reproduction, des avortements, de la mortalité néonatale et la naissance d'agneaux malformés, avec des troubles nerveux, ou chétifs. La transmission et la persistance du BDV dans les troupeaux résultent principalement de la naissance d'agneaux infectés permanents immunotolérants (IPI), qui sont excréteurs du virus tout au long de leur existence. La production d'agneaux IPI est la conséquence du passage transplacentaire du BDV, lors de l'infection de brebis gravides, entre 30 et 65 jours de gestation, période d'immunotolérance fœtale.

La vaccination est l'un des principaux moyens de contrôle des infections à pestivirus. Dans le cas du BDV, elle vise à réduire les troubles de la reproduction et à empêcher l'infection des fœtus chez les brebis gravides et, par voie de conséquence, la production d'agneaux IPI. Actuellement, il n'existe pas de vaccins spécifiques contre le BDV. Les vaccins utilisés sur le terrain sont des vaccins commercialisés contre le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV), pestivirus apparenté au BDV et capable d'infecter les ovins. Toutefois, il n'existe aucune donnée scientifique permettant d'évaluer objectivement la capacité de ces vaccins à conférer une protection fœtale vis-à-vis du BDV chez les ovins.

Le processus de validation expérimentale de l'efficacité des vaccins anti-BVDV dans l'espèce ovine, au cours d'essais cliniques contrôlés, nécessiterait de disposer au préalable d'un modèle d'infection fœtale à virus BDV chez la brebis gravide, permettant de produire des agneaux IPI. Or, un tel modèle n'existe pas.

Dans ce contexte, et en l'absence de méthode alternative in vitro, l'objectif principal de ce projet est d'établir un modèle d'infection transplacentaire à BDV chez le mouton, qui pourra être ultérieurement utilisé dans des essais d'efficacité vaccinale. Pour cela, nous testerons la capacité de 4 souches de BDV et une souche de BVDV, isolées à partir de cas de terrain, à provoquer une infection foetale chez des brebis inoculées par voie intramusculaire, entre 50 et 55 jours de gestation.

Au total, 45 brebis seront utilisées, à raison de 8 animaux par souche virale et d'un groupe témoin de 5 animaux (sentinelles) non inoculés. Tout au long de l'expérimentation, un suivi clinique et échographique des brebis sera réalisé par des vétérinaires. En outre, des prélèvements sanguins destinés à des analyses virologiques, sérologiques et hématologiques seront effectués régulièrement pour suivre l'infection virale.

Tous les animaux seront euthanasiés par injection 70 jours après inoculation, afin de récupérer les fœtus. L'infection transplacentaire et la production d'animaux IPI seront confirmées par mise en évidence du virus dans les organes fœtaux.

Cet enseignement pratique a pour objectif d'initier les étudiants à l'expérimentation animale, en leur apprenant les gestes de base tout en respectant le bien-être animal.

Il se divise en 3 séances de travaux pratiques (TP):

- TP 1: Les étudiants apprendront sur souris vigile les techniques de contention, ainsi que différentes voies d'administration (gavage, sous-cutanée, intrapéritonéale, intramusculaire, intraveineuse),

- TP 2: Les étudiants apprendront sur souris vigile les techniques de contention, ainsi que l'injection par voie intrapéritonéale et la prise de température par voie rectale. Puis ils étudieront l'effet de médicaments psychotropes sur la température et le comportement des souris à l'aide de tests psychopharmacologiques.

- TP 3: Les étudiants apprendront sur rat vigile les techniques de contention permettant de réaliser une anesthésie, puis sur rat anesthésié la pose de cathéters permettant d'effectuer l'injection de produits et d'enregistrer leurs effets sur la pression artérielle.

En 5 ans, ces enseignements pratiques nécessiteront l'utilisation de 3780 souris et 252 rats.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés pour le TP 1, chaque étudiant ou enseignant aura à sa disposition une seule souris pour réaliser les différents gestes.

Le TP 2 sera réalisé en binôme (6 souris pour 2 étudiants), ainsi que le TP 3 (1 rat pour 2 étudiants). Pour le TP 3, le faible taux d'échec (5%) des gestes enseignés permettra également de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Les enseignants feront dans un premier temps une démonstration et ensuite, ils encadreront la réalisation des gestes par les étudiants. L'objectif étant de leur montrer au mieux la réalisation de ces gestes, afin de les sensibiliser aux variations expérimentales et aux biais induits par des gestes mal préparés et mal réalisés. De plus, pour le TP 3 l'analgésie et l'anesthésie seront monitorées pendant toute l'expérience. La mise en place d'un point limite et l'observation du comportement des animaux permettront d'identifier toute souffrance et douleur.

1493- Les troubles liés au stress et notamment les troubles anxio-dépressifs ont été identifiés comme la première cause mondiale d'invalidité selon l'OMS. Ils sont associés à de profonds problèmes sanitaires et socio-économiques (souffrances psychologiques, suicides, isolement sociale, haute prévalence, chronicité, résistance au traitement, première cause d'absentéisme et de maladies professionnels, burn-outs). Les mécanismes neurobiologiques par lequel le stress chronique affecte les fonctions cérébrales demeurent méconnus. Pourtant leur élucidation ainsi que l'identification des circuits menant à la rémission sont essentielles pour le développement de meilleures stratégies thérapeutiques. Ainsi, notre projet s'inscrit dans un programme de recherche visant à comprendre ces mécanismes et, plus particulièrement, à tester l'implication de différents circuits cérébraux et structures-cibles, supposés être déterminants pour la rémission de certains symptômes, à travers l'utilisation de méthode optogénétique : 1) le noyau accumbens pour le symptôme d'anhédonie, 2) le cortex préfrontal pour les dysfonctions exécutives, 3) l'amygdale, 4) le BNST et 5) le septum latéral pour l'anxiété, la réactivité émotionnelle et la réponse physiologique au stress.

L'optogénétique a été appelée méthode de l'année en 2010 par le journal Nature Methods. Elle combine génétique et fibre optique pour contrôler l'activité de populations neuronales spécifiques. En effet, il est possible d'insérer dans des structures cérébrales des gènes d'opsines (protéines sensibles à la lumière et capables de contrôler l'activité neuronale). L'objectif de notre programme de recherche est donc de contrôler l'activité de circuits impliquant une région cérébrale appelée hippocampe dans le but de tester leur rôle dans le traitement de différents symptômes en utilisant un modèle animal chez la souris.

La procédure décrite dans cette saisine va nous permettre d'examiner la présence de projections hippocampique dans les structures-cibles précédemment citées et de déterminer avec précision les coordonnées exactes des projections de l'hippocampe dans ces structures-cibles (en vue de l'utilisation de fibre optique pour nos futures expériences d'optogénétique dans des modèles de stress chroniques légers) ainsi que l'identification précise de la sous-population de neurones hippocampiques projetant vers ces structures cibles.

Remplacement L'identification précise des circuits cérébraux et l'évaluation des effets comportementaux et cognitifs du stress chronique (et de son traitement) peuvent uniquement être réalisées dans des cerveaux entiers et chez des organismes vivants. Il est impossible d'effectuer des recherches de ce type dans des cultures cellulaires, sachant qu'elles ne peuvent reproduire l'organisation complexe d'un cerveau intact. Il n'est bien sûr pas éthiquement acceptable d'utiliser des sujets humains pour ce type de projet qui nécessitent de modifier le matériel génétique et l'activité neuronale in vivo à des fins expérimentales. Le choix de l'espèce animale utilisée s'est donc portée sur la souris, mammifère dont les structures cérébrales et les fonctions cognitives présentent suffisamment d'homologie avec l'homme pour modéliser au moins en partie ces troubles et d'en étudier les mécanismes.

Réduction : il s'agit d'une étude préliminaire afin d'évaluer la présence de projections hippocampique dans les 5 structures-cibles et de déterminer les coordonnées stéréotaxiques exactes pour l'implantation de canule de fibre optique pour nos futures expériences d'optogénétique. Cette approche nous permet d'utiliser un nombre réduit d'animaux (n=6 par structure-cible, 30 souris au total). Six souris par structure-cible seront nécessaires car le cerveau de souris est petit, ces structures ou la localisation des projections hippocampiques peuvent être particulièrement restreintes et limitées et l'utilisation de cette technique dans nos futures expériences demanderont une très grande précision d'implantation. On aura donc besoin certainement de plusieurs réglages et essais pour chaque structure afin de déterminer les meilleures coordonnées pour nos futures implantations. Le nombre de six animaux est donc un nombre limité mais raisonnable pour ce type d'études préliminaires et pas trop faible pour représenter un investissement non 'rentable'.

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (animaux maintenus en grande cages, avec objets, tube et abris). Les injections intracérébrales se feront sous anesthésie générale et seront réalisées par des chercheurs formés et expérimentés. Les soins opératoires et le suivi post-opératoire seront effectués à travers une procédure standard rigoureuse et une observation appuyée des animaux afin d'optimiser la gestion de la douleur, de réduire au maximum l'inconfort et d'éviter/traiter toute infection. Par la suite, les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement optimales et ne seront sujets à aucune procédure pouvant affecter leur bien-être ou causer des douleurs. D'un point de vue scientifique, l'optogénétique représente la méthode de ciblage de populations neuronales la plus spécifique actuellement. Le développement de cette méthode innovante comme proposé dans notre projet permettra d'éviter l'utilisation des traditionnelles méthodes électrolytiques ou chimiques de lésion cérébrale qui sont bien plus traumatiques pour les tissus, présentent des risques élevés de pertes fonctionnelles sérieuses pour les animaux et sont beaucoup moins spécifiques pour évaluer l'implication fonctionnelle de circuits cérébraux.

1494- Les accidents vasculaires cérébraux, dont 80% sont d'origine ischémique, représentent la première cause de handicap de l'adulte. Actuellement, il n'existe aucun traitement pouvant améliorer la récupération après un accident vasculaire cérébral, excepté les traitements de la phase aiguë (thrombolyse, thrombectomie) qui restent limités aux premières heures post-accident vasculaire cérébral et donc à un très faible nombre de patients. Ainsi, le développement de traitements innovants tels que la thérapie cellulaire régénérative est un enjeu majeur pour limiter le handicap post-accidents vasculaire cérébral.

Les résultats expérimentaux concernant la thérapie cellulaire post-accident vasculaire cérébral sont encourageants et ils ont été complétés par de premiers essais cliniques de phase 2. Par contre, la forte mortalité des cellules implantées dans ces zones hypoxiques limite l'efficacité du traitement. Pour améliorer la survie du greffon et son efficacité, l'utilisation de thérapies cellulaires combinées avec des injections intra-cérébrale de matrices (e.g. hydrogels injectables) porteuses des cellules à greffer semble prometteuse.

L'objectif de cette étude sera donc d'évaluer la tolérance et l'efficacité de la greffe intra-cérébrale de cellules souches mésoenchymateuses adultes mélangées dans hydrogel après un infarctus cérébral chez le rat.

Nos critères d'évaluation seront: effet fonctionnel par suivi comportemental pour évaluer la récupération motrice, effet sur la lésion (imagerie par résonance magnétique), immunohistologie avec étude de la survie des cellules dans l'hydrogel.

Ce projet portant sur l'étude de la réponse d'organe entier et de tissus complexes (cérébraux et vasculaires) à la thérapie cellulaire, il nous est

impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Le projet requerra l'utilisation de 619 rats maximum. Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés sans compromettre la validité des expériences qui seront menées et afin que les résultats puissent être statistiquement représentatifs pour chaque expérience. Le nombre minimum d'animaux permettant de réaliser l'expérience sans compromettre les objectifs du projet sera ainsi utilisé.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance (notamment, suppression de la douleur grâce à l'administration d'antalgiques).

1495- L'examen de la composante vasculaire est fondamental pour la compréhension des processus tumoraux ou de réparation tissulaire. Les techniques d'imagerie dynamique sont de plus en plus rapides et précises et autorisent un suivi longitudinal du petit animal, respectant ainsi la règle des 3R. Parmi celles-ci, les nouvelles générations de Micro-Scanners haute résolution pour petit animal vivant offrent une possibilité d'acquisition rapide, non invasive (faibles doses) et à une très haute résolution (autour de 10 microns). Cependant, à ce jour, l'examen de la composante vasculaire avec ces scanners est difficilement réalisable en suivi longitudinal chez le rongeur car il implique majoritairement l'emploi de produits de contraste létaux. En effet, s'il existe déjà des produits de contraste vasculaire non létaux en échographie ou scanner humain ainsi qu'en échographie souris, les produits de contraste vasculaire en scanner X souris sont soit terminaux (cas des produits barytés ou iodés), soit peu sensibles, peu résolutifs et avec une élimination rénale ultra-rapide (cas des produits non létaux). Aussi, l'utilisation de ces agents n'est pas compatible avec un suivi dynamique et longitudinal de la vascularisation, en particulier si l'examen concerne une zone anatomique nécessitant des résolutions poussées, telle que la sphère orofaciale. Très récemment (2014), sont apparus des produits de contraste vasculaire de dernière génération, non létaux et théoriquement compatibles avec des résolutions poussées.

Le but de ce projet : Valider l'utilisation de produits de contraste de dernière génération non létaux chez la souris permettant un suivi longitudinal de la vascularisation orofaciale par Micro-CT haute résolution, en comparaison à des agents de contraste létaux (ex : produit baryté). Le but final est de mettre au point une technique de suivi longitudinal de la vascularisation par Micro-CT chez la souris afin de l'utiliser pour l'étude de processus pathologiques ou de réparation et de limiter ainsi le nombre de souris étudiées.

Les expériences seront effectuées sur des souris anesthésiées (mélange kétamine/xylazine). Après injection intraveineuse d'un agent de contraste (produits Miltenyi Biotec, agents barytés ou iodés), les souris sont ensuite examinées par imagerie dynamique en scanner X haute résolution.

Le nombre de souris envisagé (50 sur 12 mois) est justifié en fonction des effets observés et permet d'envisager une étude adéquate sur le plan méthodologique et de raffiner la méthodologie. Il n'existe pas de méthode alternative permettant de réaliser cette étude du réseau vasculaire.

1496- Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre,

c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les transferts de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité.

L'effectif des animaux engagés dans chaque protocole est établi en corrélation avec la quantité d'immun-sérum à produire et selon les rendements précédemment obtenus. En se basant sur ces données, nous faisons une demande pour 15 protocoles, représentant 300 lapins.

Le temps d'immunisation est de 357 jours. Cette durée permet l'obtention d'une grande quantité d'anticorps spécifiques à un lot composé de plusieurs lapins.

Les immun-sérums récupérés sont ensuite purifiés par le client afin de récupérer les anticorps reconnaissant spécifiquement l'antigène d'intérêt. Ces anticorps sont produits en grande quantité pour entrer dans la fabrication de trousse de diagnostic à grande échelle.

Dans la production d'anticorps polyclonaux, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, ...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

1497- L'optogénétique a été appelée méthode de l'année en 2010 par le journal Nature Methods. Elle combine génétique et fibre optique pour contrôler l'activité de populations neuronales spécifiques. En effet, il est possible d'insérer dans des structures cérébrales des gènes d'opsines (protéines sensibles à la lumière et capables de contrôler l'activité neuronale) Par la suite, la stimulation optique de ces protéines permet d'activer ou d'inhiber sélectivement des projections cérébrales spécifiques. L'objectif de notre programme de recherche est d'inhiber des projections bien précises d'une région cérébrale appelée l'hippocampe. Le but de ce protocole est la mise au point de la méthode, en particulier la mise au point de l'administration des vecteurs dans différents sites de l'hippocampe et la détermination de l'effet des temps d'incubation sur l'expression des opsines.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude:

Remplacement : L'identification précise des circuits cérébraux et l'évaluation de leurs fonctions comportementales et cognitives peuvent uniquement être réalisées dans des cerveaux entiers et chez des organismes vivants. Il est impossible d'effectuer des recherches de ce type dans des cultures cellulaires, sachant qu'elles ne peuvent reproduire l'organisation complexe d'un cerveau intact. Il n'est bien sûr pas éthiquement acceptable d'utiliser des sujets humains pour ce type de projet qui nécessitent de modifier le matériel génétique et l'activité neuronale in vivo à des fins expérimentales. Le choix de l'espèce animale utilisée s'est donc portée sur la souris, mammifère dont les structures cérébrales et les fonctions cognitives présentent suffisamment d'homologie avec l'homme pour étudier ces circuits et ces mécanismes.

Réduction : Ce projet est basé sur la mise en place d'une méthode d'optogénétique. Il s'agit donc d'une phase de mise au point pour de futures expériences. Cette approche nous permet d'utiliser un nombre réduit d'animaux par groupe : 3 par temps d'incubation (4) et par site d'injection (4) - total = 48 souris (3x4x4).

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (animaux maintenus en grande cages, avec objets, tube et abris). Les injections intracérébrales se feront sous anesthésie générale et seront réalisées par des chercheurs formés et expérimentés. Les soins opératoires et le suivi post-opératoire seront effectués à travers une procédure standard rigoureuse et une observation appuyée des animaux afin d'optimiser la gestion de la douleur, de réduire au maximum l'inconfort et d'éviter/traiter toute infection. Par la suite, les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement optimales et ne seront sujets à aucune procédure pouvant affecter leur bien-être ou causer douleurs, souffrance ou stress. D'un point de vue scientifique, l'optogénétique représente la méthode de ciblage de populations neuronales la plus spécifique actuellement. Le développement de cette méthode innovante comme proposé dans notre projet permettra d'éviter l'utilisation des traditionnelles méthodes électrolytiques ou chimiques de lésion cérébrale qui sont bien plus traumatiques pour les tissus, présentent des risques élevés de pertes fonctionnelles sérieuses pour les animaux et sont beaucoup moins spécifiques pour évaluer l'implication fonctionnelle de circuits cérébraux.

1498- Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux pour le compte de différentes équipes de recherche publique et privée.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est à dire portant des réceptions qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de 5 ou 6 acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement

ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule) affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, anti-sérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les transferts de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitations, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire); lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, une purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérums (choix des animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps),
- la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps,
- la fonction effective des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps,
- l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP car il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérums à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 1100 protocoles, représentant 2200 lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 42 ou 63 jours, selon la procédure expérimentale.

Dans la population d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible, la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cages individuelles, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceaux de bois à ronger, ...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

1499- L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de produits du soja et de coproduits issus d'un procédé de transformation utilisée par l'industrie agro-alimentaire.

Diverses vertus sont attribuées à certains constituants du soja : propriété antioxydante, anti-inflammatoire, œstrogéniques ou anti-œstrogéniques voire anti-cancéreuse. Le soja, comme la plupart des plantes de la famille des Fabaceae (« légumineuses ») contient notamment des quantités significatives d'isoflavones (polyphénols) dont les plus courantes dans la nature sont la génistéine et la daidzéine ainsi que leurs formes conjuguées. Les isoflavones sont des phytoœstrogènes qui présentent donc des effets œstrogéniques.

Des facteurs de stress (exposition aux UV, congélation, exposition aux micro-organismes...) ou les procédés de transformation utilisés par l'industrie agro-alimentaire induisent une bioconversion de ces isoflavones en phytoalexines : la daidzéine est ainsi bioconvertie en phytoalexines dénommées glycéollines I, II et III. Les glycéollines possèdent majoritairement une activité anti-œstrogéniques et, de ce fait, pourraient jouer un rôle favorable pour la santé humaine en participant à la prévention de cancers œstrogéno-dépendants ou en participant à lutter contre les troubles de la ménopause.

Notre objectif est donc de développer les connaissances sur les mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires des glycéollines I, II et III : mieux définir leur mode d'action et mieux comprendre leur potentiel œstrogénique/anti-œstrogénique (ou SERM pour « Selective Estrogen Receptor Modulators ») dans différents contextes cellulaires (cellules mammaires, cellules utérines et cellules nerveuses). Cet objectif implique donc une étape d'évaluation in vitro de la capacité des phytoalexines à favoriser ou à inhiber la prolifération, la différenciation et la protection œstrogéno-dépendante de lignées cellulaires mammaires, utérines et neuronales. L'approche in vitro permettra de définir la mécanistique mise en œuvre dans ces effets.

Une étude in vivo est également indispensable afin d'appréhender ces effets dans un contexte physiologique intégré. En effet, même si nos modèles cellulaires permettront de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à la base des effets des glycéollines, ils ne permettront pas de connaître les effets de ces molécules à l'échelle de l'organe, de l'organisme entier,

sur l'homéostasie de l'animal et ne constituent donc pas une alternative à l'expérimentation animale. Très peu de données existent sur les effets des glycéollines *in vivo* et l'étude sur l'animal est un prérequis indispensable pour l'utilisation, à plus long terme, de ces molécules pour la santé animale et humaine.

Ainsi, la capacité œstrogénique/anti-œstrogénique des molécules sera évaluée *in vivo* (modèles murins). Nous utiliserons donc pour cette étude des souris femelles non ovariectomisées et non traitées, qui constitueront les animaux contrôles de notre expérience. Ces animaux seront comparés à des souris ovariectomisées (afin de s'affranchir de toute influence hormonale endogène), traitées par injections sous-cutanées d'œstradiol (E2), d'isoflavones (génistéine, daidzaine), de glycéollines (I, II et III) ou par des combinaisons (E2 + isoflavones ; E2 + glycéollines).

Les effets seront évalués par la mesure de l'expression de gènes œstrogène-sensibles et par des analyses morpho-histologiques et immunohistologiques de l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation dans la sphère génitale (utérus, épithélium vaginal et glande mammaire). L'impact global sur les marques épigénétiques sera également évalué dans ces tissus. D'autre part, les cellules épithéliales mammaires des animaux traités ou non seront isolées des glandes mammaires puis mises en culture afin de caractériser les mécanismes liés à leur prolifération leur différenciation et leur organisation en tissu excréteur. Enfin, des prélèvements de sang et du foie seront également réalisés afin de mesurer les éventuels effets métaboliques des molécules. Le grand nombre de prélèvements différents effectués permettront de limiter les répétitions d'expérience et de valoriser au mieux les animaux utilisés.

Les variations inter-individus imposent l'utilisation d'un nombre minimum d'animaux. D'après les recommandations de l'OCDE, nous avons choisi d'utiliser huit animaux par lot. Dès leur réception dans notre animalerie, les animaux seront répartis par lots, dans un environnement enrichi, et manipulés chaque jour par les expérimentateurs afin de limiter le stress lié aux conditions d'hébergement et dévaluer quotidiennement l'état de bien-être des animaux et d'appliquer les points limites s'ils présentent des signes de souffrance.

1500- Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes à l'origine des conséquences délétères de l'hypoxie intermittente chronique (HIC), un modèle du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAS). Cette pathologie touche 5 à 20% de la population et est associée à de nombreuses autres pathologies parmi lesquelles, les pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension ou l'infarctus du myocarde.

Le SAS est le trouble respiratoire nocturne le plus fréquent dans la population et est un facteur de risque indépendant de la survenue d'événements cardiovasculaires fatals et non fatals. Si le traitement actuel de référence du SAOS semble fonctionner lorsqu'il est bien toléré, il apparaît essentiel de comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies associées dans le but de proposer des compléments ou des alternatives thérapeutiques à ce traitement. Le SAS est caractérisé par plusieurs composantes dont l'hypoxie intermittente (HI) chronique connue pour avoir le plus fort impact en termes de conséquences délétères cardiovasculaires. Ainsi, d'un point de vue scientifique, dans le but d'étudier de nombreux mécanismes susceptibles d'expliquer la mort cellulaire induite par l'HI chronique, l'utilisation de l'expérimentation animale est indispensable.

Particulièrement, nous nous intéressons à divers acteurs connus pour être impliqués dans les phénomènes de survie ou de mort des cardiomyocytes suite à des protocoles d'ischémie-reperfusion (I/R), mimant l'infarctus du myocarde. Pour réaliser ce projet, nous avons donc besoin d'exposer des souris (transgéniques ou non) à la normoxie ou à l'HI, de réaliser la techniques d'I/R myocardique, *in vivo*, et enfin d'avoir recours à des techniques de prélèvements du myocarde suivies de biologie cellulaire, moléculaire et de biologie des protéines

Le projet a pour but de comprendre comment l'activation de l'axe « stress du RE-HIF-1 » par l'HI entraîne une augmentation de la taille d'infarctus.

Nous avons choisi de travailler avec des souris (528) exposées à la normoxie ou à l'HIC pour plusieurs raisons. L'utilisation d'un modèle murin est encouragé par nos travaux précédents dans lesquels nous avons reproduit les conséquences délétères du SAS et aussi parce que la souris nous permet de tester nos hypothèses à l'aide d'absence d'expression de certains gènes (animaux transgéniques). Les lignées de cardiomyocytes de souris adultes n'existent pas et il est donc nécessaire de travailler avec des cardiomyocytes de souris adultes provenant d'une isolation de cœurs de souris adultes. Tous les échantillons seront conservés de façon optimale dans le but de pérenniser notre matériel de travail. Le choix des techniques est varié et nous sommes dans l'obligation d'utiliser diverses techniques (*in vivo* et *ex vivo*) pour tester nos hypothèses très mécanistiques.

Enfin, concernant le bien-être des animaux, ils seront hébergés selon les règles de bien-être des animaux dans une animalerie adaptée et autorisée. Les animaux ne seront jamais manipulés dès leur arrivée dans l'animalerie mais uniquement après 8 jours de stabulation. Les animaux seront observés quotidiennement dans leur cage d'hébergement pour s'assurer qu'il ne sont pas stressés et qu'ils ont accès à l'eau et à la nourriture à volonté.